

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот

из клинических образцов

«РеалБест Сорбитус»

(вариант 4×24)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов «РеалБест Сорбитус» предназначен для выделения нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из клинических образцов (мазки из носа, носоглотки, ротоглотки, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж), взятых у лиц с симптомами респираторных инфекций, контактных лиц и лиц без признаков респираторных заболеваний, находящихся в инфекционных очагах, с целью выявления возбудителей респираторных инфекций методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридиционно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Вариант 4×24 набора применяется для ручной процедуры выделения нуклеиновых кислот из клинического материала. Возможно применение набора с использованием станции автоматической пробоподготовки «KingFisher Flex» производства «Thermo Fisher Scientific» (Финляндия). Допускается адаптация других станций автоматического выделения нуклеиновых кислот открытого типа для работы с набором.

Вариант 4×24 набора рассчитан на выделение нуклеиновых кислот из 96 образцов объемом 0,1 мл, включая контрольные образцы. Обеспечивает возможность проведения до 4 независимых процедур выделения по 24 образца в каждой, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип действия набора «РеалБест Сорбитус» состоит в температурной обработке образца многокомпонентным лизирующим раствором, который разрушает комплексы

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

нуклеиновых кислот с белками и обеспечивает условия, при которых нуклеиновые кислоты сорбируются на поверхности магнитных частиц. После этого магнитные частицы проводятся через серию отмывок, в ходе которых нуклеиновые кислоты остаются сорбированными на поверхности магнитных частиц, и элюцию, в ходе которой нуклеиновые кислоты переходят с поверхности частиц в элюирующий раствор. После этого проба готова к постановке ПЦР/ОТ-ПЦР.

Эффективность пробоподготовки в каждом исследуемом образце оценивается с помощью внутреннего контрольного образца (ВКО), входящего в состав набора и проходящего все стадии пробоподготовки и следующих за ней ПЦР или ОТ-ПЦР вместе с выделяемыми нуклеиновыми кислотами. Положительный контрольный образец (ПКО) входит в состав ПЦР-наборов для выявления инфекционной РНК/ДНК. ПКО проходит процедуру выделения наравне с биологическими пробами и отрицательным контрольным образцом (ОКО).

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) <i>Описание.</i>	Количество
Сорбент <i>Суспензия магнитных частиц, содержит натрия аزيد (0,05 %)</i>	1 флакон 1 мл
Раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия аزيد (0,05 %)</i>	2 флакона по 4 мл
Отрицательный контрольный образец (ОКО) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия аزيد (0,05 %)</i>	2 флакона по 1 мл
Внутренний контрольный образец (ВКО) <i>Лиофилизированный</i>	4 флакона
Ванночки для реагентов	4 шт.
Комплект для выделения НК - 4 пакета, каждый включает:	
Лизирующий раствор <i>Жидкость от бесцветного до жёлтого цвета, допускается наличие осадка, исчезающего при нагревании содержит гуанидина изотиоцианат (56,7 %)</i>	1 флакон 15 мл
Раствор для отмывки № 1 <i>Бесцветная жидкость</i>	1 флакон 28 мл
Раствор для отмывки № 2 <i>Бесцветная жидкость</i>	1 флакон 28 мл
Элюирующий раствор <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия аزيد (0,05 %)</i>	1 флакон 20 мл

3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Эффективность выделения НК, определенная по стандартному образцу предприятия, содержащему образцы РНК и ДНК (СОП 05-2-867), как процентное содержание образцов, выходящих в заданном диапазоне Ct, составляет 100 %.

3.2. Эффективность выделения НК, определенная на 138 клинических образцах и 46 модельных пробах, составила 100 % (интервал 98,0 %-100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению НК возбудителей респираторных инфекций, обязаны обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия. К работе с набором допускается только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедший подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с патогенными для человека микроорганизмами и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

4.3. ОКО, сорбент, РВК и элюирующий раствор содержат натрия азид; лизирующий раствор содержит гуанидинизотиоцианат в концентрациях, указанных в п. 2.2 «Состав набора». При работе с лизирующим раствором следует надевать одноразовые медицинские перчатки, избегать попадания его компонентов на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженное место большим количеством проточной воды.

4.4. 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».

4.5. При работе с набором необходимо надевать одноразовые медицинские перчатки, использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

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

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: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова», 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% 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, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». 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 (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы»);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» (например, «Bio-Vortex V-1 plus», «BioSan», Латвия);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, «Sartorius», Германия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, «Sartorius», Германия);
- одноразовые наконечники для дозаторов без защитного фильтра (например, «Sarstedt», Германия);
- контейнер для дезинфицирующего раствора (например, «Контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», «КМ-Проект», Россия);

При ручной процедуре:

- микроцентрифуга (например, «Eppendorf MiniSpin», «Eppendorf», Германия);
- термошейкер – термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий проводить перемешивание при 1300 об/мин и температуре (60–90) °С (например, «Thermo Shaker TS-100» [с блоком для 24 пробирок объемом 2,0 мл], «BioSan», Латвия);
- отсасыватель медицинский В-40 (например, «ВИСМА-ПЛАНАР», Россия);
- одноразовые полипропиленовые пробирки на 2 мл (например, «Sarstedt», Германия);
- магнитный штатив на 24 пробирки вместимостью 2 мл (например, АО «Вектор-Бест», Россия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл.

При автоматической процедуре:

- станция автоматической пробоподготовки KingFisher Flex («Thermo Fisher Scientific»,

Финляндия);

- планшеты глубоколоночные на 2 мл (например, «Thermo Fisher Scientific», Финляндия);
- насадка на магнитную головку (например, «Thermo Fisher Scientific», Финляндия);
- дозатор восьмиканальный электронный переменного объема, со сменными наконечниками, обеспечивающий возможность дозирования объемов не менее 1000 мкл (например, «Thermo Fisher Scientific», Финляндия);

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и другим государственными нормативными актами, действующим на момент использования набора.

При проведении работ с клиническими образцами в лаборатории необходимо обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Материалом для исследования являются мазки из носа, носоглотки, ротоглотки, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж.

6.1.1. Мазки из носа, носоглотки, ротоглотки забираются с помощью стерильных зондов в транспортный раствор (АО «Вектор-Бест» или аналогичный, зарегистрированный в установленном порядке в РФ).

6.1.2. Подготовка образцов мокроты.

К образцу добавить равный объём 95% этилового спирта. Тщательно перемешать, выдержать при температуре (18-26) °C 10 минут. Ещё раз тщательно перемешать. 100 мкл полученной взвеси использовать для выделения нуклеиновых кислот.

Не захватывать комки слизи!

6.1.3. Подготовка образцов бронхоальвеолярного лаважа.

В пробирку с защелкой объёмом 1.5-2 мл отобрать 1 мл клинического материала и центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 10 минут. Удалить 0,9 мл надосадочной жидкости, осадок ресуспендировать. Если образцы содержат слизь, провести процедуру из п.6.1.2.

Транспортировать и хранить образцы:

- при температуре (2–8) °C не более 5 суток;
- при температуре минус 70°C длительно.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения НК, должна содержать отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом данного набора, и положительный контрольный образец (ПКО), который является компонентом

набора для выявления НК соответствующего возбудителя инфекции.

6.1.4. Образцы (мазки из носа, носоглотки, ротоглотки, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж), содержащие потенциально интерферирующие вещества - муцин до концентрации 5% и цельную кровь до концентрации 5%, пригодны для использования.

6.2. Подготовка компонентов набора.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать компоненты набора при температуре (18-26) °С не менее 30 минут.

6.2.2. Флакон с лизирующим раствором перед началом работы прогреть при температуре (50–60) °С до растворения осадка (не менее 30 минут), содержимое флакона перемешать переворачиванием и выдержать при температуре (18-26) °С не менее 30 минут.

6.2.3. Вскрыть флакон с ВКО, добавить 1 мл РВК, аккуратно перемешать, выдержать при температуре (18–26)°С 15 минут, после чего вновь перемешать.

Внимание! Раствор ВКО можно хранить при температуре (2–8) °С не более суток.

7. ВЫДЕЛЕНИЕ НК ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ. РУЧНАЯ ПРОЦЕДУРА

7.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок на 2 мл – по количеству исследуемых образцов, включая контроли (1 ПКО и 1 ОКО).

7.2. Во флакон с лизирующим раствором добавить **250 мкл раствора ВКО**.

7.3. Тщательно перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом и добавить во флакон с лизирующим раствором с ВКО **150 мкл суспензии сорбента**.

Один флакон с лизирующим раствором рассчитан на проведение процедуры выделения НК из 24 образцов, включая контрольные образцы.

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

7.4. Перемешать лизирующий раствор с ВКО и сорбентом переворачиванием флакона. В подготовленные (п. 7.1.) пробирки внести по **500 мкл лизирующего раствора с ВКО и сорбентом**.

Внимание! В процессе розлива лизирующего раствора с ВКО и сорбентом необходимо следить, чтобы смесь оставалась однородной. Необходимо придерживаться следующего правила: с момента последнего перемешивания лизирующего раствора с ВКО и сорбентом должно проходить не более 1 минуты; если за это время процесс розлива лизирующего раствора с ВКО и сорбентом не был завершён, следует закрыть флакон крышкой и аккуратно перемешать смесь переворачиванием, после чего продолжить розлив.

7.5. В пробирку положительного контроля выделения внести **70 мкл ОКО** и **30 мкл ПКО** (является компонентом набора для ПЦР/ОТ-ПЦР). Для внесения контрольных образцов использовать наконечники с аэрозольным барьером.

7.6. В пробирку отрицательного контроля выделения внести **100 мкл ОКО**, используя

наконечник с аэрозольным барьером.

7.7. В остальные пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя наконечники с аэрозольным барьером.

Рекомендация. В соответствии с требованиями, предъявляемыми к обработке исследуемого материала, инфицированного (подозрительного на инфицирование) микроорганизмами I - II групп патогенности, в случае отсутствия возможности проведения всей процедуры выделения НК в условиях, обеспечивающих соблюдение действующих правил санитарной безопасности, рекомендуется:

- a) передать пробирки с внесенным на стадии 7.4 лизирующим раствором с ВКО и сорбентом в рабочую зону, в которой происходит обработка и обеззараживание биологических образцов с соблюдением действующих требований санитарной безопасности;*
- b) провести процедуры внесения анализируемых и контрольных образцов в соответствии с пунктами 7.5-7.7 настоящей инструкции;*
- c) поместить пробирки в термостат, предварительно прогретый до 65°C. Инкубировать при температуре 65°C в течение 15 минут;*
- d) после инкубации вынуть пробирки из термостата и передать в зону выделения НК.*

7.8. Пробирки поместить в термошейкер и инкубировать при 60°C с частотой вращения 800 об/мин в течение 15 минут.

7.9. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок. Поместить пробирки в магнитный штатив и выдержать **2 минуты**.

7.10. Из каждой пробирки с помощью медицинского отсасывателя максимально полно удалить надосадочную жидкость, используя отдельный наконечник (без фильтра) и **не прикасаясь к осадку магнитных частиц**.

7.11. В каждую пробирку на магнитном штативе внести по **1 мл раствора для отмывки № 1**, выдержать 2 минуты (можно не закрывать пробирки).

7.12. Из каждой пробирки с помощью медицинского отсасывателя максимально полно удалить надосадочную жидкость, используя отдельный наконечник (без фильтра) и **не прикасаясь к осадку магнитных частиц**.

7.13. В каждую пробирку на магнитном штативе внести по **1 мл раствора для отмывки № 2**, выдержать 2 минуты (можно не закрывать пробирки).

7.14. Из каждой пробирки с помощью медицинского отсасывателя максимально полно удалить надосадочную жидкость, используя отдельный наконечник (без фильтра) и **не прикасаясь к осадку магнитных частиц**.

7.15. В каждую пробирку внести по **200 мкл элюирующего раствора**, не задевая стенок. При касании стенки или жидкости в пробирке наконечник необходимо сменить!

При необходимости проведения исследования сразу на несколько маркеров объем элюирующего раствора может быть увеличен до **600 мкл**.

7.16. Перенести пробирки в термошейкер и инкубировать при 90°C с частотой вращения 800 об/мин в течение 5 минут.

7.17. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок. Поместить пробирки в магнитный штатив и выдержать **5 минут**.

7.18. Образцы из пробирок, находящихся в магнитном штативе, раскапать в реакционные смеси для ПЦР- и/или ОТ-ПЦР-анализа.

Внимание! Выделенную НК можно хранить при температуре (2–8) °C не более суток.

7.19. Между окончанием раскапывания элюата в реакционные смеси и постановкой реакционных смесей в амплификатор должно пройти не более 15 минут.

8. ВЫДЕЛЕНИЕ НК ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТАНЦИИ KingFisher Flex.

8.1. Добавить во флакон с лизирующим раствором **250 мкл ВКО**. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом и добавить во флакон с лизирующим раствором **150 мкл суспензии сорбента**, перемешать. Один флакон с лизирующим раствором рассчитан на выделение НК из 24 образцов, включая контрольные образцы.

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

8.2. Промаркировать 5 глубоколоночных планшетов: ЛР, РО1, РО2, ЭР, ГР – по 1 планшету. Один комплект планшетов позволяет провести выделение НК из 96 образцов, включая контроли. При внесении реагентов и образцов ориентировать планшеты следует таким образом, чтобы лунка A1 находилась слева сверху.

Для внесения реагентов в лунки планшета рекомендуется использовать восьмиканальный электронный дозатор и ванночки для реагентов.

8.3. Составить схему размещения контрольных и исследуемых образцов в глубоколоночном планшете на трафарете (Таблица 1). Количество контрольных образцов указано в инструкции к набору для ПЦР (ОТ-ПЦР).

Таблица 1.

Схема размещения контрольных и исследуемых образцов.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ПКО	№7	№15									
B	ОКО	№8	№16									
C	№1	№9	№17									
D	№2	№10	№18									

E	№3	№11	№19									
F	№4	№12	№20									
G	№5	№13	№21									
H	№6	№14	№22									

8.4. В глубоколоночный планшет ГР поместить насадку на магнитную головку.

8.5. В лунки глубоколоночного планшета РО1 добавить по 500 мкл раствора для отмывки № 1 согласно схеме размещения образцов.

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

8.7. В лунки глубоколоночного планшета ЭР добавить по 200 мкл элюирующего раствора согласно схеме размещения образцов.

8.8. Перемешать флакон с лизирующим раствором с ВКО и сорбентом переворачиванием. В лунки глубоколоночного планшета ЛР внести по **500 мкл лизирующего раствора с ВКО и сорбентом** согласно схеме размещения образцов.

Внимание! В процессе розлива лизирующего раствора с сорбентом необходимо следить, чтобы суспензия оставалась однородной. Необходимо придерживаться следующего правила: с момента последнего перемешивания лизирующего раствора с ВКО и сорбентом должно проходить не более 1 минуты; если за это время процесс розлива лизирующего раствора с ВКО и сорбентом не был завершён, следует аккуратно перемешать суспензию пипетированием, после чего продолжить розлив.

8.9. В одну лунку глубоколоночного планшета ЛР внести 30 мкл ПКО (является компонентом набора для ПЦР/ОТ-ПЦР) и 70 мкл ОКО, согласно схеме размещения образцов, используя наконечники с аэрозольным барьером.

8.10. В одну лунку глубоколоночного планшета ЛР внести 100 мкл ОКО, согласно схеме размещения образцов, используя наконечник с аэрозольным барьером.

8.11. В остальные лунки глубоколоночного планшета ЛР внести по 100 мкл исследуемых образцов, согласно схеме размещения образцов, используя наконечники с аэрозольным барьером.

Рекомендация. В соответствии с требованиями, предъявляемыми к обработке исследуемого материала, инфицированного (подозрительного на инфицирование) микроорганизмами I - II групп патогенности, в случае отсутствия возможности проведения всей процедуры выделения НК в условиях, обеспечивающих соблюдение действующих правил санитарной безопасности, рекомендуется:

- а) передать глубоколоночный планшет ЛР с внесенным на стадии 8.8 лизирующим раствором с ВКО и сорбентом в рабочую зону, в которой происходит обработка

и обеззараживание биологических образцов с соблюдением действующих требований санитарной безопасности;

- b) провести процедуры внесения анализируемых и контрольных образцов в соответствии с пунктами 8.9-8.11 настоящей инструкции;
- c) планшет ЛР с внесенными образцами накрыть фильтровальной бумагой, сверху накрыть металлической решёткой;
- d) поместить планшет в термостат, предварительно прогретый до 65 °С. Инкубировать при температуре 65 °С в течение 15 минут;
- e) после инкубации вынуть глубоколоночный планшет из термостата и передать в зону выделения НК на станции KingFisher Flex.

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

8.13. Запустить на персональном компьютере программное обеспечение «BindIt for KingFisher» и выбрать протокол выделения нуклеиновых кислот **«РеалБест Сорбитус»**.

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

8.15. По окончании протокола выделения НК прибор подаст звуковой сигнал.

8.16. После окончания процедуры пробоподготовки извлечь планшет ЭР из станции и выдержать при температуре (18-26) °С в течение 10 минут.

При необходимости проведения исследования сразу на несколько маркеров объём элюирующего раствора может быть увеличен до **600 мкл**. Для этого в соответствующие лунки планшета ЭР (согласно схеме размещения образцов) добавить по 400 мкл элюирующего раствора.

8.17. Образцы, находящиеся в глубоколоночном планшете ЭР, раскапать в реакционные смеси для ПЦР- и/или ОТ-ПЦР-анализа.

Внимание! Выделенную НК можно хранить при температуре (2–8) °С не более суток.

8.18. Между окончанием раскапывания элюата и постановкой реакционных смесей в амплификатор должно пройти не более 15 минут.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. 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 26 °С не более 10 суток.

9.2. 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.

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

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

9.5. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. 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.

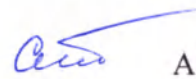
По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест Сорбитус», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

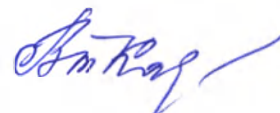
тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»

 А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

Директор клинических исследований
и дополнительных сервисов Дирекции
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»

 Я.Э. Новикова



Прошито в количестве 11 листов
«15» марта 2023 года
Директор клинических исследований и
дополнительных сервисов Дирекции
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»

Я. Э. Новикова



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

15 марта 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот

из клинических образцов

«РеалБест Сорбитус»

(вариант 1×96)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов «Реал-Бест Сорбитус» предназначен для выделения нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из клинических образцов (мазки из носа, носоглотки, ротоглотки, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж), взятых у лиц с симптомами респираторных инфекций, контактных лиц и лиц без признаков респираторных заболеваний, находящихся в инфекционных очагах, с целью выявления возбудителей респираторных инфекций методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибрида-зационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Вариант 1×96 набора применяется для выделения нуклеиновых кислот из клиниче-ского материала с использованием станции автоматической пробоподготовки «KingFisher Flex» производства «Thermo Fisher Scientific» (Финляндия). Допускается адаптация других станций автоматического выделения нуклеиновых кислот открытого типа для работы с набо-ром.

Вариант 1×96 набора обеспечивает возможность проведения процедуры выделения из 96 образцов объемом 0,1 мл, включая контрольные образцы.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип действия набора «РеалБест Сорбитус» состоит в температурной обработке образца многокомпонентным лизирующим раствором, который разрушает комплексы нуклеиновых кислот с белками и обеспечивает условия, при которых нуклеиновые кислоты сорбируются на поверхности магнитных частиц. После этого магнитные частицы проводятся через серию отмывок, в ходе которых нуклеиновые кислоты остаются сорбированными на поверхности магнитных частиц, и элюцию, в ходе которой нуклеиновые кислоты переходят с поверхности частиц в элюирующий раствор. После этого проба готова к постановке ПЦР/ОТ-ПЦР.

Эффективность пробоподготовки в каждом исследуемом образце оценивается с помощью внутреннего контрольного образца (ВКО), входящего в состав набора и проходящего все стадии пробоподготовки и следующих за ней ПЦР или ОТ-ПЦР вместе с выделяемыми нуклеиновыми кислотами. Положительный контрольный образец (ПКО) входит в состав ПЦР-наборов для выявления инфекционной РНК/ДНК. ПКО проходит процедуру выделения наравне с биологическими пробами и отрицательным контрольным образцом (ОКО).

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) <i>Описание.</i>	Количество
Лизирующий раствор <i>Жидкость от бесцветного до жёлтого цвета, допускается наличие осадка, исчезающего при нагревании содержит гуанидина изотиоцианат (56,7 %)</i>	1 флакон 56 мл
Раствор для отмывки № 1 <i>Бесцветная жидкость</i>	1 флакон 110 мл
Раствор для отмывки № 2 <i>Бесцветная жидкость</i>	1 флакон 110 мл
Элюирующий раствор <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05 %)</i>	1 флакон 70 мл
Сорбент <i>Суспензия магнитных частиц, содержит натрия азид (0,05 %)</i>	1 флакон 1 мл
Раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05 %)</i>	1 флакон 4 мл
Отрицательный контрольный образец (ОКО) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05 %)</i>	1 флакон 1 мл
Внутренний контрольный образец (ВКО) <i>Лиофилизированный</i>	1 флакон
Ванночки для реагентов	4 шт.

3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Эффективность выделения НК, определенная по стандартному образцу предприятия, содержащему образцы РНК и ДНК (СОП 05-2-867), как процентное содержание образцов, выходящих в заданном диапазоне C_t , составляет 100 %.

3.2. Эффективность выделения НК, определенная на 138 клинических образцах и 46 модельных пробах, составила 100 % (интервал 98,0 %-100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению НК возбудителей респираторных инфекций, обязаны обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия. К работе с набором допускается только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедший подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с патогенными для человека микроорганизмами и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

4.3. ОКО, сорбент, РВК и элюирующий раствор содержат натрия азид; лизирующий раствор содержит гуанидинизотиоциат в концентрациях, указанных в п. 2.2 «Состав набора». При работе с лизирующим раствором следует надевать одноразовые медицинские перчатки, избегать попадания его компонентов на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженное место большим количеством проточной воды.

4.4. 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».

4.5. При работе с набором необходимо надевать одноразовые медицинские перчатки, использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

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

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: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% 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, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». 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 (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы»);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» (например, «Bio-Vortex V-1 plus», «BioSan», Латвия);
- станция автоматической пробоподготовки KingFisher Flex («Thermo Fisher Scientific», Финляндия);
- планшеты глубоколоночные на 2 мл (например, «Thermo Fisher Scientific», Финляндия);
- насадка на магнитную головку (например, «Thermo Fisher Scientific», Финляндия);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, «Sartorius», Германия);
- дозатор восьмиканальный электронный переменного объема, со сменными наконечниками, обеспечивающий возможность дозирования объемов не менее 1000 мкл (например, «Thermo Fisher Scientific», Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером

(например, «Sartorius», Германия);

– контейнер для дезинфицирующего раствора (например, «Контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», «КМ-Проект», Россия);

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и другим государственными нормативными актами, действующим на момент использования набора.

При проведении работ с клиническими образцами в лаборатории необходимо обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Материалом для исследования являются мазки из носа, носоглотки, ротоглотки, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж.

6.1.1. Мазки из носа, носоглотки, ротоглотки забираются с помощью стерильных зондов в транспортный раствор (АО «Вектор-Бест» или аналогичный, зарегистрированный в установленном порядке в РФ).

6.1.2. Подготовка образцов мокроты.

К образцу добавить равный объём 95% этилового спирта. Тщательно перемешать, выдержать при температуре (18-26) °С 10 минут. Ещё раз тщательно перемешать. 100 мкл полученной взвеси использовать для выделения нуклеиновых кислот.

Не захватывать комки слизи!

6.1.3. Подготовка образцов бронхоальвеолярного лаважа.

В пробирку с защелкой объёмом 1.5-2 мл отобрать 1 мл клинического материала и центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 10 минут. Удалить 0,9 мл надосадочной жидкости, осадок ресуспендировать. Если образцы содержат слизь, провести процедуру из п.6.1.2.

Транспортировать и хранить образцы:

- при температуре (2–8) °С не более 5 суток;
- при температуре минус 70°С длительно.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения НК, должна содержать отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом данного набора, и положительный контрольный образец (ПКО), который является компонентом набора для выявления НК соответствующего возбудителя инфекции.

6.1.4. Образцы (мазки из носа, носоглотки, ротоглотки, мокрота, бронхоальвеолярный

лаваж), содержащие потенциально интерферирующие вещества - муцин до концентрации 5% и цельную кровь до концентрации 5%, пригодны для использования.

6.2. Подготовка компонентов набора.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать компоненты набора при температуре (18-26) °С не менее 30 минут.

6.2.2. Флакон с лизирующим раствором перед началом работы прогреть при температуре (50–60) °С для растворения осадка в течение 30 минут, перемешать переворачиванием и выдержать при температуре (18-26) °С не менее 30 минут.

6.2.3. Вскрыть флакон с ВКО, добавить 1,2 мл РВК, аккуратно перемешать, выдержать при температуре (18–26)°С 15 минут, после чего вновь перемешать.

Внимание! Раствор ВКО можно хранить при температуре (2–8) °С не более суток.

7. ВЫДЕЛЕНИЕ НК ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

7.1. Добавить во флакон с лизирующим раствором 1 мл ВКО. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом и добавить во флакон с лизирующим раствором 600 мкл суспензии сорбента, перемешать.

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

7.2. Промаркировать 5 глубоколоночных планшетов: ЛР, РО1, РО2, ЭР, ГР – по 1 планшету. Один комплект планшетов позволяет провести выделение НК из 96 образцов, включая контроли. При внесении реагентов и образцов ориентировать планшеты следует таким образом, чтобы лунка А1 находилась слева сверху.

Для внесения реагентов в лунки планшета рекомендуется использовать восьмиканальный электронный дозатор и ванночки для реагентов.

7.3. Составить схему размещения контрольных и исследуемых образцов в глубоколоночном планшете на трафарете (Таблица 1). Количество контрольных образцов указано в инструкции к набору для ПЦР (ОТ-ПЦР).

Таблица 1.

Схема размещения контрольных и исследуемых образцов.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	ПКО	№7	№15									
В	ОКО	№8	№16									
С	№1	№9	№17									
Д	№2	№10	№18									
Е	№3	№11										№91
F	№4	№12										№92
G	№5	№13										№93
Н	№6	№14										№94

7.4. В глубоколоночный планшет ГР поместить насадку на магнитную головку.

7.5. В лунки глубоколоночного планшета РО1 добавить по 500 мкл раствора для отмывки № 1.

7.6. В лунки глубоколоночного планшета РО2 добавить по 500 мкл раствора для отмывки № 2.

7.7. В лунки глубоколоночного планшета ЭР добавить по 200 мкл элюирующего раствора.

7.8. Перемешать флакон с лизирующим раствором с ВКО и сорбентом переворачиванием. В лунки глубоколоночного планшета ЛР внести по **500 мкл лизирующего раствора с ВКО и сорбентом.**

Внимание! В процессе розлива лизирующего раствора с сорбентом необходимо следить, чтобы суспензия оставалась однородной. Необходимо придерживаться следующего правила: с момента последнего перемешивания лизирующего раствора с ВКО и сорбентом должно проходить не более 1 минуты; если за это время процесс розлива лизирующего раствора с ВКО и сорбентом не был завершён, следует аккуратно перемешать суспензию пипетированием, после чего продолжить розлив.

7.9. В одну лунку глубоколоночного планшета ЛР внести 30 мкл ПКО (является компонентом набора для ПЦР/ОТ-ПЦР) и 70 мкл ОКО, согласно схеме размещения образцов, используя наконечники с аэрозольным барьером.

7.10. В одну лунку глубоколоночного планшета ЛР внести 100 мкл ОКО, согласно схеме размещения образцов, используя наконечник с аэрозольным барьером.

7.11. В остальные лунки глубоколоночного планшета ЛР внести по 100 мкл исследуемых образцов, согласно схеме размещения образцов, используя наконечники с аэрозольным барьером.

Рекомендация. В соответствии с требованиями, предъявляемыми к обработке исследуемого материала, инфицированного (подозрительного на инфицирование) микроорганизмами I - II групп патогенности, в случае отсутствия возможности проведения всей процедуры выделения НК в условиях, обеспечивающих соблюдение действующих правил санитарной безопасности, рекомендуется:

- a) передать глубоколоночный планшет ЛР с внесенным на стадии 7.8 лизирующим раствором с ВКО и сорбентом в рабочую зону I, в которой происходит обработка и обеззараживание биологических образцов;
- b) провести процедуры внесения анализируемых и контрольных образцов в соответствии с пунктами 7.9-7.11 настоящей инструкции в рабочей зоне I;
- c) планшет ЛР с внесенными образцами накрыть фильтровальной бумагой, сверху

накрыть металлической решёткой;

- d) поместить планшет в термостат, предварительно прогретый до 65 °С. Инкубировать при температуре 65 °С в течение 15 минут;
- e) после инкубации вынуть глубоколоночный планшет из термостата и передать в зону выделения НК на станции KingFisher Flex.

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

7.13. Запустить на персональном компьютере программное обеспечение «BindIt for KingFisher» и выбрать протокол выделения нуклеиновых кислот **«РеалБест Сорбитус»**.

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

7.15. По окончании протокола выделения НК прибор подаст звуковой сигнал.

7.16. После окончания процедуры пробоподготовки извлечь планшет ЭР из станции и выдержать при температуре (18-26) °С в течение 10 минут.

При необходимости проведения исследования сразу на несколько маркеров объём элюирующего раствора может быть увеличен до 600 мкл. Для этого в соответствующие лунки планшета ЭР (согласно схеме размещения образцов) добавить по 400 мкл элюирующего раствора.

7.17. Образцы, находящиеся в глубоколоночном планшете ЭР, раскапать в реакционные смеси для ПЦР- и/или ОТ-ПЦР-анализа.

Внимание! Выделенную НК можно хранить при температуре (2–8) °С не более суток.

7.18. Между окончанием раскапывания элюата и постановкой реакционных смесей в амплификатор должно пройти не более 15 минут.

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 26 °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.

8.5. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

9.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

9.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших 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.

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492.

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

Директор клинических исследований
и дополнительных сервисов Дирекции
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»

А.В. Трухина

 В.К. Ткачев

Я.Э. Новикова



Прошито в количестве 9 листов
«15» марта 2023 года
Директор клинических исследований и
дополнительных сервисов Дирекции
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»

Я. Э. Новикова

