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

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 «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 РНК коронавируса SARS-CoV-2 и ДНК Mycoplasma pneumoniae методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Вариант 1×96 набора применяется для выделения нуклеиновых кислот из клинического 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 набором.

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

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

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

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

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 гуанидинизотиоцинат 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.

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

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 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 (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 глубоколуночные 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);

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

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.

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

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 глубоколуночных 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 глубоколуночном 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										№91
F	№4	№12										№92
G	№5	№13										№93
H	№6	№14										№94

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

7.5. В лунки глубоколуночного планшета РО1 добавить по 500 мкл раствора для отмывки

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

№ 1.

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

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

7.8. Перемешать флакон с лизирующим раствором с ВКО и сорбентом переворачиванием. В лунки глубоколуночного 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 глубоколуночного 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 глубоколуночного планшета ЛР внести 100 мкл ОКО, согласно схеме размещения образцов, используя наконечник с аэрозольным барьером.

7.11. В остальные лунки глубоколуночного 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 глубоколуночный 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;*

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

d) поместить планшет в термостат, предварительно прогретый до 65 °С. Инкубировать при температуре 65 °С в течение 15 минут;

e) после инкубации вынуть глубоколуночный 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 глубоколуночные 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 глубоколуночном 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[1] со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

1 Не верифицировано данными исследования в режиме реального времени

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

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

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

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, 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.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест Сорбитус», 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