

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НПФ «Литех»

А.Ю.Наумов

«06» ноября 2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
«Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала
НК-сорбент для диагностики *in vitro*»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **НК-сорбент** предназначен для выделения нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из образцов биологического материала человека (биологические жидкости: отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта и носоглотки, секрет предстательной железы, моча, мокрота, плевральная жидкость, сперма, цельная кровь, сыворотка или плазма, отделяемое из ран, ликвор, синовиальная жидкость, слюна, экссудат; кал; образцы тканей; смывы, мазки и соскобы с оболочек органов и тканей) для последующего анализа полученных препаратов НК методами ПЦР-диагностики (в том числе ПЦР-РВ, ОТ-ПЦР) с целью диагностики наследственных особенностей организма человека или патологий, предполагающей анализ последовательности НК.

Функциональное назначение. Набор **НК-сорбент** представляет собой реагенты для этапа пробоподготовки образцов с целью последующего анализа нуклеиновых кислот и является вспомогательным средством на аналитическом этапе клинических лабораторных исследований по установлению этиологии заболеваний, наследственных особенностей организма или патологий, мониторинга течения болезни и факторов риска патологий, а также проведения санитарно-эпидемиологического контроля.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА – клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению. Набор реагентов **НК-сорбент** может быть использован в клинической лабораторной диагностике на этапе пробоподготовки для выделения ДНК и РНК из клинических образцов с целью последующего анализа посредством ПЦР.

3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА - сотрудники клиническо-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ДНК-диагностики.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор **НК-сорбент** рассчитан на проведение экстракции 100 образцов и выпускается в 8 вариантах исполнения, предназначенных для разных видов клинического материала.

Вариант исполнения «Base» содержит реагенты, предназначенные для экстракции НК из всех видов биологических образцов организма и входит неизменным в состав всех вариантов исполнения набора **НК-сорбент**.

Другие варианты исполнения набора дополнены вспомогательными комплектами, которые учитывают особенности разных видов клинических образцов и предназначены для предварительной обработки материала с целью более полной экстракции НК (табл. 1).

Таблица 1

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
1.	«Base»	1. Раствор 1 2. Раствор 2	1 флакон – 45 мл 1 флакон – 40 мл

		3. Раствор 3 4. Раствор 4 5. Раствор для элюции 6. Сорбент 7. ЭВК*	1 флакон – 100 мл 1 флакон – 40 мл 6 пробирок по 2 мл 3 пробирки по 1 мл 1 пробирка – 1100 мкл
2.	«Sputum»	НК-сорбент. Вариант исполнения «Base». Комплект для разжижения мокроты	1 шт. 1 шт.
3.	«Tissue»	НК-сорбент. Вариант исполнения «Base». Комплект для лизиса тканей	1 шт. 1 шт.
4.	«Feces»	НК-сорбент. Вариант исполнения «Base». Комплект для предобработки кала	1 шт. 1 шт.
5.	«Blood»	НК-сорбент. Вариант исполнения «Base». Комплект для предобработки цельной крови	1 шт. 1 шт.
6.	«Serum»	НК-сорбент. Вариант исполнения «Base». Комплект для концентрирования НК	1 шт. 1 шт.
7.	«Urine»	НК-сорбент. Вариант исполнения «Base». Комплект для предобработки цельной мочи	1 шт. 4 шт.
8.	«Complex»	НК-сорбент. Вариант исполнения «Base». Комплект для разжижения мокроты Комплект для лизиса тканей Комплект для предобработки кала Комплект для предобработки цельной крови Комплект для концентрирования НК Комплект для предобработки цельной мочи	1 шт. 1 шт 1 шт 1 шт 1 шт 1 шт 1 шт

*ЭВК – экзогенный внутренний контроль, предназначен для добавления в клинические образцы, обедненные генетическим материалом человека, для контроля выделения пробы и прохождения ПЦР при использовании наборов производства ООО НПФ «Литех».

Состав вспомогательных комплектов для предобработки клинических образцов.

Таблица 2

№	Название комплекта	Состав	Варианты фасовки
1.	Комплект для разжижения мокроты	1. АЦЦ* 2. Раствор NaOH 3. Раствор цитрата натрия	1 флакон – 0,5 г 1 флакон – 50 мл 1 флакон – 50 мл
2.	Комплект для лизиса тканей	1. Лизирующий раствор 2. Раствор для разведения протеиназы К 3. Протеиназа К	1 флакон – 12 мл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 5 мг
3.	Комплект для предобработки кала	1. Раствор 1 2. Сорбент 3. Раствор для элюции	1 флакон – 45 мл 3 пробирки по 1 мл 5 пробирок по 2 мл
4.	Комплект для предобработки цельной крови	1. Раствор К	1 флакон – 10 мл
5.	Комплект для концентрирования НК	1. Концентрирующий раствор 1 2. Концентрирующий раствор 2	1 флакон – 40 мл 1 флакон – 40 мл
6.	Комплект для предобработки цельной мочи	1. Стабилизатор 2. Раствор Р 3. Сорбент	25 пробирок по 5 г 1 флакон – 30 мл 2 пробирки по 1 мл.

*АЦЦ - N-ацетил-L-цистеин.

Вариант исполнения «Base» содержит готовые к применению реагенты, предназначенные для выделения НК из всех биологических образцов организма.

Выделение НК из биологических жидкостей: отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта и носоглотки, секрета предстательной железы, мочи, сыворотки или плазмы крови, отделяемого из ран, ликвора, синовиальной жидкости, экссудата; промывных вод; смывов, мазков и соскобов с оболочек органов и тканей проводят вариантом исполнения «Base» набора НК-сорбент без дополнительной предварительной обработки исследуемого материала.

Вариант исполнения «**Sputum**» включает, кроме основного варианта исполнения «**Base**» набора **НК-сорбент**, «Комплект для разжижения мокроты», предназначенный для дополнительной предварительной обработки исследуемого материала (мокроты, плевральной жидкости, спермы), предшествующей экстракции НК.

Вариант исполнения «**Feces**» включает, кроме основного варианта исполнения «**Base**» набора **НК-сорбент**, дополнительный «Комплект для предобработки кала» и содержит готовые к применению реактивы и предназначен для выделения НК из кала.

Вариант исполнения «**Tissue**» включает основной вариант исполнения «**Base**» набора **НК-сорбент** и дополнительный «Комплект для лизиса тканей», содержит готовые к применению реактивы и предназначен для выделения НК из биопсийного материала (образцов тканей).

Вариант исполнения «**Blood**» включает, кроме основного варианта исполнения «**Base**» набора **НК-сорбент**, дополнительный «Комплект для предобработки цельной крови» и содержит готовые к применению реактивы, предназначенные для выделения НК из цельной крови.

Вариант исполнения «**Serum**» включает основной вариант исполнения «**Base**» набора **НК-сорбент** и дополнительный «Комплект для концентрирования НК» и содержит готовые к применению реактивы, предназначенные для выделения НК из сыворотки или плазмы крови.

Вариант исполнения «**Urine**» включает, кроме основного варианта исполнения «**Base**» набора **НК-сорбент**, дополнительный «Комплект для предобработки цельной мочи» и содержит готовые к применению реактивы, предназначенные для выделения НК из цельной мочи.

Вариант исполнения «**Complex**», кроме основного варианта исполнения «**Base**» набора **НК-сорбент**, включает дополнительно «Комплект для разжижения мокроты», «Комплект для предобработки кала», «Комплект для лизиса тканей», «Комплект для предобработки цельной крови», «Комплект для концентрирования НК», «Комплект для предобработки цельной мочи» и содержит готовые к применению реактивы, предназначенные для выделения НК из всех видов клинических образцов, заявленных в разделе «Назначение» данной инструкции.

4.2. Принцип метода

Принцип действия набора **НК-сорбент** состоит в обработке клинической пробы лизирующими растворами в присутствии сорбента. В результате происходит разрушение клеточных оболочек и различных внутриклеточных комплексов и высвобождение нуклеиновой кислоты (НК). «Свободная» НК далее связывается с частицами сорбента, в то время как прочие компоненты лизированной клетки удаляются посредством многократных циклов отмывки и центрифугирования. Десорбция НК с сорбента происходит посредством элюции. В результате получается очищенный препарат НК, свободный от ингибиторов ПЦР-реакции, который может быть использован для дальнейшего анализа.

4.3. Ограничения метода и интерферирующие вещества

Выделение генетического материала из клинических образцов осуществляется посредством сорбции НК на пористом силикатном носителе. Поэтому избыточное присутствие в образце примесных веществ, способных взаимодействовать с сорбентом (жиры, липопротеины, компоненты крови), может приводить к уменьшению удельной сорбционной поверхности, тем самым снижая эффективность выделения НК на порядок.

Производителем было показано сохранение эффективности выделения НК в диапазоне 80-100% в случае присутствия в клинических образцах потенциальных интерферирующих веществ в концентрациях, соответствующих верхней границе физиологической нормы, и превышающих их в несколько раз.

Таблица 3

образец	интерферент	допустимое содержание в образце
отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	кровь	10%
	слизь	20%
отделяемое носоглотки и конъюнктивы	кровь	10%

моча	мочевина	150 мМ
	гемоглобин	7,5 мг/л
	белок	2 г/л
	жиры	30%
секрет предстательной железы	кровь	10%
	жиры	30%
ликвор	кровь	10%
	жиры	10%
слюна	кровь	10%
экссудат	белок	80 г/л
синовиальная жидкость	кровь	10%
сперма	кровь	10%
	жиры	50%
мокрота и плевральная жидкость	кровь	30%
сыворотка и плазма крови, цельная кровь	гемоглобин	3 г/л (сыворотка и плазма)
	билирубин	20,5 мкмоль/л
	холестерин	5 ммоль/л
	триглицериды	2,25 ммоль/л
	миоглобин	160 нг/мл
	К2-ЭДТА	1,8 мг/мл
	цитрат натрия	0,129 моль/л
смывы и отделяемое ран	кровь	20%
	гной	25%
кал	полисахариды	25%
	желчные кислоты	100 мг/л
	жир	единичные включения
	мышечные волокна	
	эпителий	
	элементы крови	
	слизь	незначительное
биоптат	кровь	10%
	жир	50%

Снижение эффективности выделения НК наблюдалось в ряде случаев для образцов с содержанием примеси крови 50% и жиров (липопротеинов) 60%. Для клинических образцов подобное содержание примеси крови и жиров встречается крайне редко и свидетельствует о неправильном заборе материала, в том числе по причине критического состояния пациента, кровотечения в месте забора материала, несоблюдении рекомендаций по сдаче анализа (в частности, диеты). Такие образцы должны быть отбракованы на преаналитическом этапе анализа и не подвергаться дальнейшему исследованию.

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

5.1. Эффективность выделения

Эффективность выделения НК из клинических образцов с помощью набора **НК-сорбент** составляет 80-100%.

5.2. Качество (чистота) препарата экстрагированной НК.

Набор **НК-сорбент** позволяет получить препарат НК хорошего качества очистки (чистоты), достаточного для последующего проведения исследований методами ПЦР (в том числе ОТ-ПЦР, ПЦР-РВ).

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Корреляция результатов клинических испытаний, проведенных на НК, выделенных из 450 клинических образцов (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, отделяемое конъюнктивы, отделяемое слизистой оболочки носоглотки, мочи, секрет предстательной железы, ликвор, слюна, экссудат, синовиальная жидкость, сперма, сыворотка и плазма крови, мокрота, плевральная жидкость, цельная кровь, кал, биоптат, смывы из ротоглотки, отделяемое ран), наборами реагентов сравнения «ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС», «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА», «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» и исследуемым набором реагентов «НК-сорбент», является высокой, что свидетельствует о получении в результате экстракции набором **НК-сорбент** нуклеиновых кислот надлежащего качества и очистки (отсутствие ингибиторов ПЦР) для молекулярной диагностики и сопоставимости эффективности выделения ДНК и РНК из образцов клинического материала при использовании сравниваемых медицинских изделий.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2a

7.1. Требования безопасности при работе с набором

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

7.1.1. Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

7.1.2. Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

7.1.3. Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

7.1.4. Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

7.1.5. При работе с Раствором 1 и Раствором 2 следует выполнять следующие требования: избегать прямого контакта реагентов с глазами, кожей и одеждой. Реагент может вызывать раздражение глаз, кожи и слизистых оболочек; в случае контакта с реагентом, немедленно промыть кожу большим количеством воды; при контакте реагента с глазами промыть большим количеством воды и немедленно обратиться за медицинской помощью; если реагент случайно проглочен, немедленно вызвать врача!

7.1.6. При работе с Раствором 3 и Раствором 4 строго соблюдать правила противопожарной безопасности.

7.1.7. Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III–IV групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

7.1.8. Не использовать набор по истечении срока годности.

7.2. Требования охраны окружающей среды

7.2.1. Набор реагентов не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности. В том числе в случае отклонений в функционировании медицинского изделия, включая определяемые по внешним признакам.

7.2.2. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.

7.2.3. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав набора не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

7.2.4. Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. Реагенты, входящие в состав набора, безопасны для окружающей среды, не содержат цианид и азид натрия, а также другие вредные вещества.

7.2.5. Набор реагентов не содержит: лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсibilизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

8. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для всех вариантов исполнения набора:

- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- микроцентрифуга, развивающая ускорение до 12000 об/мин (16000 g), "MiniSpin" (фирма Eppendorff, Германия);
- микроцентрифуга-вортекс на 1500-3000 об/мин "FV-2400" (фирма "Биосан", Латвия);
- центрифуга, развивающая ускорение до 3500 об/мин «СМ-6М» (фирма ELMi, Латвия);
- твердотельный термостат «Термит» («ДНК-технология», Россия);
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с переменным или фиксированным объемом, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (ошибка не более 3%) (фирма «ТермоЭлектрон», Россия);
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;
- одноразовые наконечники без фильтра до 100 или до 200 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 1000;
- аспиратор с колбой-ловушкой для отбора надсадочной жидкости;
- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 мл, 2,0 мл, 15,0 мл;
- холодильник для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

Дополнительно для комплектаций «Complex» и «Sputum»:

- весы лабораторные II класса точности с дискретностью 0,01 г.

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

9.1. Материал для исследования

Материалом для экстракции набором **НК-сорбент** являются клинические образцы биологического материала человека (биологические жидкости: отделяемое слизистых оболочек

урогенитального тракта и носоглотки, секрет предстательной железы, моча, мокрота, плевральная жидкость, сперма, цельная кровь, сыворотка или плазма, отделяемое из ран, ликвор, синовиальная жидкость, слюна, экссудат; кал; образцы тканей; смывы, мазки и соскобы с оболочек органов и тканей).

9.2. Взятие биологического материала.

9.2.1. Общие рекомендации по взятию биоматериала.

9.2.1.1. Взятие биоматериала производится из предполагаемого места обитания микроорганизма.

9.2.1.2. Объем отбираемого биоматериала не должен быть избыточным. При взятии мазков и соскобов достаточно получить материал в объеме «спичечной головки». Идеальный инструмент для взятия соскобов и мазков — специальный урогенитальный зонд (щеточка), который собирает необходимое количество эпителия, не травмируя слизистую. Присутствие в исследуемом материале большого количества слизи и примеси крови могут привести как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам.

9.2.1.3. Для взятия проб необходимо пользоваться только одноразовым инструментом и стерильными пластиковыми контейнерами (или пробирками) с плотно закрывающейся крышкой.

9.2.1.4. При подготовке проб НК для диагностики инфекционных заболеваний взятие биоматериала, по возможности, должно проводиться в период обострения инфекции. За 10 дней до исследования необходимо прекратить прием химиопрепаратов, антибиотиков, средств гормональной терапии. Контроль эффективности лечения должен проводиться не ранее чем через 3-4 недели после окончания терапии.

9.2.2. Материал из уретры (соскоб эпителиальных клеток).

9.2.2.1. Перед взятием материала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5-2 часов.

9.2.2.2. Непосредственно перед взятием материала наружное отверстие уретры необходимо обработать тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором.

При наличии гнойных выделений соскоб рекомендуется брать через 15-20 мин. после мочеиспускания, при отсутствии выделений необходимо провести массаж уретры с помощью зонда для взятия материала.

9.2.2.3. У женщин перед введением зонда в уретру проводится ее массаж о лобковое сочленение.

В уретру у женщин зонд вводится на глубину 1,0-1,5 см, у мужчин — на 3-4 см, и затем делается несколько осторожных вращательных движений. У детей материал для исследования берут только с наружного отверстия уретры.

9.2.2.4. После взятия материала зонд переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора или в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.3. Материал из цервикального канала (соскоб эпителиальных клеток).

9.2.3.1. Перед взятием материала необходимо удалить ватным тампоном слизь и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором.

9.2.3.2. Зонд вводится в цервикальный канал на глубину 0,5-1,5 см, материал собирается осторожными вращательными движениями. При извлечении зонда необходимо полностью исключить его касание со стенками влагалища.

При наличии эрозий цервикального канала необходимо их обработать стерильным физиологическим раствором, материал следует брать на границе здоровой и измененной ткани.

9.2.3.3. После взятия материала зонд переносят в пробирку типа Эппендорф

вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора или в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.4. Материал из влагалища (мазок с заднего свода).

9.2.4.1. Материал должен быть взят до проведения мануального исследования. Зеркало перед манипуляцией можно смочить горячей водой, применение антисептиков для обработки зеркала противопоказано.

9.2.4.2. В случае избытка слизи или обильных выделений необходимо удалить их стерильным ватным тампоном.

9.2.4.3. Влагалищное отделяемое собирают стерильным одноразовым зондом из заднего нижнего свода или с патологически измененных участков слизистой. У девочек материал нужно забирать со слизистой оболочки преддверия влагалища, в отдельных случаях — из заднего свода влагалища через гименальные кольца.

9.2.4.4. После взятия материала зонд переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора или в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.5. Секрет предстательной железы.

9.2.5.1. Перед взятием секрета простаты головка полового члена обрабатывается стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором.

9.2.5.2. После предварительного массажа простаты через прямую кишку врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке полового члена.

9.2.5.3. Затем из кавернозной части выдавливается 0,5-1 мл простатического секрета, который собирается в сухую стерильную ёмкость.

9.2.6. Сперма (семенная жидкость).

Взятие спермы осуществляют в стерильный одноразовый флакон.

9.2.7. Моча.

В зависимости от назначения исследования возможно проведение анализа образцов цельной мочи или осадка мочи на наличие ДНК и РНК патогенов или мониторинга патсостояний.

9.2.7.1. Для получения осадка мочи среднюю часть утренней порции или всю утреннюю порцию мочи собирают утром натощак после тщательного туалета гениталий в сухой стерильный флакон с плотно закручивающейся крышкой. Минимальный объем мочи, необходимый для проведения анализа, составляет 20 мл. Если в лабораторию доставляется не вся собранная моча, то перед тем, как часть мочи сливается в посуду для транспортировки, ее необходимо тщательно взболтать.

9.2.7.2. Для исследования цельной мочи собрать порцию мочи в одноразовый пластиковый контейнер для сбора мочи, перемешать образец мочи переворачиванием и перелить в пробирку со стабилизатором, входящую в состав «Набора для предобработки цельной мочи», до уровня 10 мл (допустима погрешность ± 2 мл). Содержимое пробирки тщательно перемешать переворачиванием до полного растворения порошка стабилизатора.

9.2.8. Материал с конъюнктивы глаз (соскоб).

9.2.8.1. При наличии обильного гнойного отделяемого его убирают стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором.

9.2.8.2. Соскоб берут с внутренней поверхности нижнего века движением к внутреннему углу глазной щели. При взятии соскоба необходимо придерживать веко руками, чтобы при моргании ресницы не касались зонда.

9.2.8.3. После взятия материала зонд переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора или в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.9. Материал с задней стенки глотки (мазок).

9.2.9.1. Взятие материала проводится натощак или не ранее, чем через 2-4 часа после еды.

9.2.9.2. Одноразовый зонд вводят за мягкое небо в носоглотку и проводят по задней стенке глотки.

Если целью исследования являются миндалины, зонд вводится в лакуны миндалин и там ротируется.

9.2.9.3. После взятия материала зонд переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора или в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.10. Материал из носоглотки (мазок).

9.2.10.1. Взятие материала проводится натощак или не ранее, чем через 2-4 часа после еды.

9.2.10.2. При взятии материала необходимо хорошее освещение, пациент сидит против источника света, корень языка придавливают шпателем, материал берут стерильным зондом, не касаясь языка, слизистой щек и зубов.

9.2.10.3. После взятия материала зонд переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора или в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.11. Материал из зубодесневых каналов (мазок).

Мазки из зубодесневого кармана с помощью зонда собираются в стерильную пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора. Зонд тщательно отмывают и удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.12. Ректальный мазок.

В прямую кишку вводят стерильный одноразовый зонд, вращательными движениями собирают материал. После взятия материала зонд переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора или в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.13. Слюна.

9.2.13.1. За 12 часов до взятия (сбора) слюны исключается прием пищи, алкоголя и лекарственных препаратов. Непосредственно перед сбором слюны необходимо исключить использование зубной пасты и удалить зубные протезы. Перед тем, как собрать слюну, необходимо почистить зубы без зубной пасты, затем хорошо прополоскать рот без использования раздражающих средств.

9.2.13.2. Слюну выплевывают или отсасывают со дна рта одноразовым шприцем и переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл.

9.2.14. Ликвор.

Ликвор получают путем прокола поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков одноразовыми пункционными иглами. Переносят 1,0 мл ликвора в одноразовую стерильную пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл.

9.2.15. Синовиальная жидкость.

Для забора синовиальной жидкости выполняют пункцию сустава. Переносят 1,0 мл пункции в одноразовую стерильную пробирку типа Эппендор» объемом 1,5 мл.

9.2.16. Экссудат.

Забор экссудата осуществляют с помощью пункции исследуемой области, а также через дренажи. Переносят 1,0 мл забранного экссудата в одноразовую стерильную пробирку типа Эппендор» объемом 1,5 мл.

9.2.17. Мокрота.

Взятие мокроты осуществляют утром натощак до выполнения гигиенических процедур при глубоком откашливании в количестве не менее 0,5 мл в стерильный одноразовый флакон с широким горлом, завинчивающейся крышкой, объемом не менее 50 мл.

9.2.18. Плевральная жидкость.

Плевральную жидкость получают путем прокола плевральной полости одноразовой пункционной иглой. Пункцию в количестве не менее 0,5 мл переносят в стерильный одноразовый флакон с широким горлом, завинчивающейся крышкой, объемом не менее 50 мл.

9.2.19. Промывные воды бронхов, желудка, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ).

9.2.19.1. Промывные воды бронхов, БАЛ собирают в одноразовые плотно завинчивающиеся пробирки объемом 50 мл.

9.2.19.2. Промывные воды желудка следует брать натощак. Последний приём пищи должен быть не менее чем за 12 часов до взятия промывных вод желудка. Перед взятием материала для нейтрализации содержимого желудка пациент выпивает 100-150 мл раствора пищевой соды (1 чайная ложка на 1 стакан воды) на стерильной дистиллированной воде, после чего в желудок проводят стерильный желудочный зонд и собирают содержимое желудка в одноразовую плотно завинчивающуюся пробирку объемом 50 мл.

9.2.20. Смыв из ротоглотки.

9.2.20.1. Предварительно прополоскать полость рта водой.

9.2.20.2. Прополоскать ротоглотку 8-10 мл стерильного физ. Раствора в течение 10-15 сек, собрать смыв через воронку в стерильную пробирку объемом 50 мл.

9.2.21. Смыв из полости носа.

Ввести с помощью шприца по 3-5 мл стерильного физ. Расвора в оба носовых хода, собрать смыв через воронку в стерильную пробирку объемом 50 мл.

9.2.22. Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта и носоглотки, ран.

Материал из носовой полости забирают сухим стерильным ватным тампоном, который вводят вглубь полости. После взятия материала тампон переносят в пробирку с 0,5 – 1 мл физ.раствора или с транспортной средой, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.23. Кал.

Материал собирается без подготовки в чистый, сухой контейнер с широким горлышком и с плотно завинчивающейся крышкой. Кал собирают после самостоятельной дефекации в небольших количествах, из разных участков каловых масс.

9.2.24. Буккальный соскоб.

9.2.24.1. Забор буккального эпителия следует осуществлять не ранее, чем через час после еды, питья, а также курения. Перед забором материала необходимо хорошо прополоскать рот без использования раздражающих средств.

9.2.24.2. Взятие материала проводят при помощи специального одноразового инструмента (ватной палочки) путем соскоба эпителиальных клеток с внутренней поверхности щеки. Конеч ватной палочки прислонить к внутренней стороне щеки и вращать в течение 10 секунд с небольшим нажимом. Образец готов для выделения НК.

При использовании обычной ватной палочки с двумя ватными концами неиспользованный конец следует отрезать! На всех этапах взятия соскоба категорически запрещается трогать используемый ватный конец руками, а также допускать его контакт с любыми поверхностями, за исключением внутренней поверхности пакета/конверта для хранения.

9.2.25. Биопсийный материал (образцы ткани).

Взятие материала осуществляют из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с повреждением участка. Материал помещают в одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

9.2.26. Цельная кровь.

2-3 мл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку, содержащую порошок или раствор антикоагулянта (1,2 – 2,0 мг K_2 -ЭДТА или 3,8% (0,129 моль/л) раствор цитрата натрия). ГЕПАРИН ИСПОЛЬЗОВАТЬ НЕЛЬЗЯ!).

При использовании системы вакуумного забора крови используются вакутейнеры с фиолетовой крышкой (ЭДТА) или голубой (цитрат натрия).

9.2.27. Плазма крови.

2-3 мл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку, содержащую порошок или раствор антикоагулянта (1,2 – 2,0 мг K_2 -ЭДТА или 3,8% (0,129 моль/л) раствор цитрата натрия). ГЕПАРИН ИСПОЛЬЗОВАТЬ НЕЛЬЗЯ!).

При использовании системы вакуумного забора крови используются вакутейнеры с фиолетовой крышкой (с ЭДТА).

9.2.28. Сыворотка крови.

2-3 мл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пустую пробирку.

При использовании системы вакуумного забора крови используются вакутейнеры с красной крышкой (для получения сыворотки).

9.3. Транспортировка и хранение биологического материала.

Таблица 4.

Биоматериал	Транспортировка	Хранение
мазки, соскобы, отделяемое ран, отделяемое слизистых оболочек кал сперма, секрет предстательной железы	Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов, транспортировка должна производиться только в сумке-холодильнике.	Допускается хранение биопроб при +4...+8°C не более 1 суток,
моча для осадка	Собранную мочу доставляют в лабораторию в течение 1-3 часов без дополнительного охлаждения. Для получения осадка исходный материал должен быть доставлен в лабораторию как можно быстрее.	<i>Не охлаждать и не замораживать!</i> Моча для исследования должна быть свежей.
цельная моча	Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов, для выделения РНК допустима транспортировка до 5 суток. Транспортировка должна производиться только в сумке-холодильнике.	Допускается хранение биопроб при +4...+8°C не более 1 суток, для выделения РНК допустимо хранение до 5 суток (включая транспортировку).

слюна, ликвор, синовиальная жидкость, экссудат, смывы, промывные воды мокрота, плевральная жидкость	Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов, транспортировка должна производиться только в сумке-холодильнике.	<i>Не замораживать!</i> Материал для исследования должен быть свежим. Допускается хранение биопроб при +4...+8°C не более 1 суток.
плазма крови, сыворотка крови цельная кровь	Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов, транспортировка должна производиться только в сумке-холодильнике.	<i>Не замораживать!</i> Допускается хранение биопроб при +4...+8°C не более 1 суток.
буккальный соскоб	Если образец предполагается хранить или транспортировать, то палочку следует высушить на воздухе при комнатной температуре в течение трех часов, затем упаковать в промаркированный герметичный пакет или бумажный конверт. Транспортировка производиться в обычных условиях.	Допускается хранение биопроб при комнатной температуре не более 1 суток.
биопсийный материал (образцы ткани)	Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов, транспортировка должна производиться только в сумке-холодильнике с дополнительным хладэлементом.	Допускается хранение биопроб при +4...+8°C не более 1 суток,

10. ПРОВЕДЕНИЕ ЭКСТРАКЦИИ.

10.1. Процедура выделения НК из образцов мазков, соскобов, отделяемого слизистых оболочек и ран.

Для варианта исполнения «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.1.1. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.1.2. Внести в каждую пробирку по 450 мкл раствора 1.

10.1.3. Внести в каждую пробирку по 100 мкл образца.

10.1.4. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.1.5. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.1.6. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.1.7. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.1.8. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.1.9. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.1.10. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.1.11. Повторить п.10.1.10.

10.1.12. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.1.13. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.1.14. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.1.15. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.2. Процедура выделения НК из образцов буккального соскоба.

Для варианта исполнения «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.2.1. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.2.2. Внести в каждую пробирку по 450 мкл раствора 1.

10.2.3. Поместить в соответствующие пробирки палочки с буккальным соскобом ватным кончиком вниз. Отрезать палочки под крышку, закрыть пробирку и вортексировать 10 секунд. Инкубировать при комнатной температуре 5-10 минут. Открыть крышку, дополнительно поболтать палочку и аккуратно вынуть ее пинцетом, прижимая к внутренним стенкам пробирки для отжима из нее жидкости. Перед каждым новым образцом пинцет следует промывать.

10.2.4. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.2.5. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.2.6. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.2.7. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.2.8. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.2.9. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.2.10. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.2.11. Повторить п. 10.2.10.

10.2.12. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.2.13. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.2.14. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.2.15. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.3. Процедура выделения НК из образцов слюны, ликвора, синовиальной жидкости, секрета предстательной железы, экссудата.

Для варианта исполнения «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.3.1. Отцентрифугировать пробирки с образцами в течение 10-15 минут на микроцентрифуге при максимальных оборотах.

10.3.2. Тщательно удалить пипеткой верхний слой жидкости, оставив на дне около 20-30 (но не более 50) мкл.

10.3.3. Внести в каждую пробирку по 450 мкл раствора 1 и по 10 мкл ЭВК.

10.3.4. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.3.5. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.3.6. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.3.7. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.3.8. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.3.9. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.3.10. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10

тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.3.11. Повторить п. 10.3.10.

10.3.12. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.3.13. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.3.14. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.3.15. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.4. Процедура выделения НК из образцов смывов и промывных вод.

Для варианта исполнения «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.4.1. Весь объем образца смыва тщательно взболтать, отобрать 10-15 мл в стерильную центрифужную пробирку.

10.4.2. Отцентрифугировать пробирки с образцами в течение 15-20 минут при 1500-3000 об/мин на центрифуге. Надосадочную жидкость осторожно удалить, стараясь не захватить на дне 0,5-1 мл суспензии.

10.4.3. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов. Перенести суспензию осадка (0,5–1 мл) в соответствующую чистую пробирку на 1,5 мл, пробирку плотно закрыть и центрифугировать при максимальных об/мин при комнатной температуре в течение 15 сек на микроцентрифуге. Тщательно удалить пипеткой надосадочную жидкость.

10.4.4. Внести в каждую пробирку по 450 мкл раствора 1 и по 10 мкл ЭВК.

10.4.5. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.4.6. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.4.7. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.4.8. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.4.9. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.4.10. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.4.11. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.4.12. Повторить п. 10.4.11.

10.4.13. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.4.14. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.4.15. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.4.16. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.5. Процедура выделения НК из образцов мочи.

В зависимости от назначения исследования возможно проведение анализа образцов целевой мочи или осадка мочи на наличие ДНК и РНК патогенов или мониторинга патсостояний.

10.5.1. Процедура выделения НК из осадка мочи.

Для варианта исполнения «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.5.1.1. Весь объем порции мочи тщательно взболтать, отобрать 10-15 мл в стерильную центрифужную пробирку.

10.5.1.2. Отцентрифугировать пробирки с образцами в течение 15-20 минут при 1500-3000 об/мин на центрифуге. Надосадочную жидкость осторожно удалить, стараясь не захватить на дне 0,5-1 мл суспензии.

10.5.1.3. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов. Перенести суспензию осадка (0,5-1 мл) в соответствующую чистую пробирку на 1,5 мл, пробирку плотно закрыть и центрифугировать при максимальных об/мин при комнатной температуре в течение 15 сек на микроцентрифуге. Тщательно удалить пипеткой надосадочную жидкость.

В случае охлаждения образца исходной мочи рекомендуется однократно промыть осадок мочи: добавить к осадку 200-300 мкл физ. раствора, ресуспендировать на вортексе, отцентрифугировать и удалить надосадочную жидкость.

10.5.1.4. Внести в каждую пробирку по 450 мкл раствора 1.

10.5.1.5. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.5.1.6. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.5.1.7. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.5.1.8. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.5.1.9. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.5.1.10. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.5.1.11. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.5.1.12. Повторить п. 10.5.1.11.

10.5.1.13. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.5.1.14. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.5.1.15. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.5.1.16. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.5.2. Процедура выделения НК из цельной мочи.

Для вариантов исполнения «Complex» и «Urine» набора НК-сорбент.

10.5.2.1. Подготовка образцов к экстракции НК.

Для предварительной обработки образцов мочи использовать «Комплект для предобработки цельной мочи».

Внимание! В процессе хранения Раствор Р может расслаиваться, перед применением необходимо перемешать его переворачиванием.

10.5.2.1.1. В пробирки из набора с образцами мочи (10 мл) добавить по 1 мл Раствора Р, тщательно перемешать переворачиванием.

10.5.2.1.2. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, добавить в пробирки с образцами по 50 мкл ресуспендированного сорбента (из Комплекта для предобработки цельной мочи или набора «НК-сорбент» комплектации «Base»), перемешать переворачиванием.

10.5.2.1.3. Инкубировать пробирки с образцами при комнатной температуре 5 минут.

10.5.2.1.4. Отцентрифугировать 10 минут при 3500 об/мин на центрифуге. Удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой, либо перелив через край в емкость с дезинфицирующим раствором (например, аламинолом).

10.5.2.2. Экстракция НК.

Экстракцию НК из предварительно обработанных образцов мочи проводить с использованием комплектации «Base» набора **НК-сорбент**.

10.5.2.2.1. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.5.2.2.2. Добавить в пробирки с образцами по 400 мкл раствора 2, перемешать пипетированием до полного ресуспендирования сорбента, перенести суспензию в соответствующие чистые пробирки на 1,5 мл, используя отдельные наконечники для каждого образца.

10.5.2.2.3. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.5.2.2.4. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.5.2.2.5. Повторить п. 10.5.2.2.4.

10.5.2.2.6. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.5.2.2.7. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 10 минут.

10.5.2.2.8. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.5.2.2.9. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на микроцентрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК и РНК, в том числе мРНК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года, мРНК будет стабильна в образце при -18...-20°C в течение 1 недели.

10.6. Процедура выделения НК из образцов плазмы и сыворотки крови.

В зависимости от назначения исследования пробоподготовка образцов плазмы и сыворотки крови возможна базовым методом для последующего скрининга наличия ДНК и РНК патогенов или с дополнительным этапом концентрирования образцов для повышения чувствительности последующего анализа ДНК и РНК абсолютных патогенов.

10.6.1. Получение плазмы крови.

10.6.1.1. При использовании вакутейнера с ЭДТА для получения плазмы пробирку с кровью отстаивают не менее 1 часа при температуре +2° до +8°C. После этого кровь должна расслоиться на плазму и форменные элементы.

Если кровь не расслоилась, перемешать кровь переворачиванием и отобрать 1,5 мл крови в стерильную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл. Центрифугировать пробирку 5 мин при 5000 об/мин.

10.6.1.2. Не задевая интерфазу отдельными наконечниками с фильтром перенести плазму в чистую полипропиленовую пробирку.

Полученную плазму использовать для выделения НК. Плазму крови можно хранить при температуре не выше минус 18°C не более 1 месяца.

10.6.2. Получение сыворотки крови.

10.6.2.1. При использовании вакутейнера без антикоагулянта для получения сыворотки пробирку с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка или помещают в термостат при 37°C на 15 мин.

10.6.2.2. Сыворотку перенести отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Сыворотка не должна быть гемолизированной.

Полученную сыворотку использовать для выделения НК. Сыворотку крови можно хранить при температуре не выше минус 18°C не более 1 месяца.

10.6.3. Процедура выделения НК из образцов плазмы и сыворотки крови базовая.

Для варианта исполнения «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.6.3.1. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.6.3.2. Внести в каждую пробирку по 450 мкл раствора 1 и по 10 мкл ЭВК.

10.6.3.3. Внести в каждую пробирку по 100 мкл образца.

10.6.3.4. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.6.3.5. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.6.3.6. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.6.3.7. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.3.8. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.6.3.9. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.3.10. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.3.11. Повторить п. 10.6.3.10.

10.6.3.12. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10

тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.3.13. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.6.3.14. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.6.3.15. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.6.4. Процедура выделения НК из образцов плазмы и сыворотки крови с концентрированием.

Для вариантов исполнения «Complex» и «Serum» набора НК-сорбент.

10.6.4.1. Подготовка образцов к экстракции.

Для предварительной обработки образцов плазмы и сыворотки крови использовать «Комплект для концентрирования НК».

10.6.4.1.1. Исследуемые образцы сыворотки или плазмы крови перемешать и осадить капли с крышек центрифугированием в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

10.6.4.1.2. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.6.4.1.3. Внести по 800 мкл исследуемой сыворотки или плазмы крови в соответствующие пробирки на 1,5 мл.

10.6.4.1.4. Внести в пробирки по 350 мкл Концентрирующего раствора 1 и 350 мкл Концентрирующего раствора 2. Предварительно смешивать данные растворы не следует!

10.6.4.1.5. Содержимое пробирок тщательно перемешать и инкубировать 10 минут при комнатной температуре.

10.6.4.1.6. Отцентрифугировать пробирки 5 минут при 3 000 об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя аспиратор с колбой-ловушкой.

10.6.4.2. Экстракция НК.

Экстракцию НК из предварительно обработанных образцов сыворотки и плазмы крови проводить с использованием «Комплекта для концентрирования НК» и комплектации «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.6.4.2.1. Добавить к осадку в пробирках (п. 8.6.4.1.6) по 450 мкл раствора 1 и по 10 мкл ЭВК.

10.6.4.2.2. Пробирки закрыть и тщательно перемешать на вортексе в течение 2-х минут до растворения большей части осадка, осадить капли с крышек пробирок центрифугированием в течение 3-5 секунд на вортексе.

10.6.4.2.3. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.6.4.2.4. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.6.4.2.5. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.6.4.2.6. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.4.2.7. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.6.4.2.8. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.4.2.9. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.4.2.10. Повторить п. 10.6.4.2.9.

10.6.4.2.11. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.4.2.12. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.6.4.2.13. Добавить в пробирки по 80 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.6.4.2.14. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.7. Процедура выделения НК из образцов цельной крови.

Для вариантов исполнения «Complex» и «Blood» набора НК-сорбент.

10.7.1. Подготовка образцов к экстракции НК.

Для предварительной обработки образцов цельной крови использовать «Комплект для предобработки цельной крови» и набор НК-сорбент комплектации «Base».

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.7.1.1. Предварительно перемешать пробирку с цельной кровью на вортексе 5-10 сек., осадить капли с крышки пробирки коротким центрифугированием на вортексе.

10.7.1.2. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл с замком по числу образцов.

10.7.1.3. В пробирку на 1,5 мл с замком внести по 450 мкл раствора 1, по 100 мкл раствора К и 50 мкл соответствующего образца крови. Перемешать содержимое пробирки на вортексе 5-10 сек., осадить капли с крышки пробирки коротким центрифугированием.

10.7.1.4. Прогреть пробирки при 99°C в течение 10 минут.

10.7.1.5. Отцентрифугировать пробирки 1 минуту при 13-14 тыс.об/мин на микроцентрифуге.

10.7.1.6. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл с замком по числу образцов. Перенести супернатант (надосадок) в соответствующую чистую пробирку на 1,5 мл.

10.7.2. Экстракция НК.

Экстракцию НК из предварительно обработанных образцов цельной крови проводить с использованием комплектации «**Base**» набора **НК-сорбент**.

10.7.2.1. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.7.2.2. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.7.2.3. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.7.2.4. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.7.2.5. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.7.2.6. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.7.2.7. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.7.2.8. Повторить п. 10.7.2.7.

10.7.2.9. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.7.2.10. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.7.2.11. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.7.2.12. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.8. Процедура выделения НК из образцов кала.

Для вариантов исполнения «Complex» и «Feces» набора НК-сорбент.

10.8.1. Подготовка образцов к экстракции НК.

Для предварительной обработки образцов кала использовать «Комплект для предобработки кала» и набор **НК-сорбент** комплектации **«Base»**.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.8.1.1. Из исследуемых образцов кала приготовить суспензии в физ.растворе с концентрацией 1 г/мл.

10.8.1.2. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.8.1.3. Внести в пробирки на 1,5 мл по 450 мкл раствора 1 (из «Комплекта для предобработки кала» или набора **НК-сорбент** комплектации **«Base»**) и 200 мкл соответствующей приготовленной суспензии образца кала с помощью индивидуального наконечника с широким отверстием.

10.8.1.4. Перемешать содержимое пробирок на вортексе, осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

10.8.1.5. Прогреть пробирки в термостате при 70°C в течение 10 минут.

10.8.1.6. Отцентрифугировать пробирки в течение 1 минуты при 13-14 тыс.об/мин на микроцентрифуге.

10.8.1.7. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.8.1.8. Перенести надосадочную жидкость в соответствующую чистую пробирку на 1,5 мл, используя индивидуальный наконечник.

10.8.1.9. Внести в пробирки по 450 мкл раствора 1(из «Комплекта для предобработки кала» или набора **«Base»**) и по 10 мкл ЭВК (из набора **НК-сорбент** комплектации **«Base»**).

10.8.1.10. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 50 мкл ресуспендированного сорбента (из «Комплекта для предобработки кала» или набора **НК-сорбент** комплектации **«Base»**).

10.8.1.11. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.8.2. Экстракция НК.

Экстракцию НК из предварительно обработанных образцов кала проводить с использованием комплектации **«Base»** набора **НК-сорбент**.

10.8.2.1. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.8.2.2. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.8.2.3. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.8.2.4. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.8.2.5. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.8.2.6. Повторить п. 10.8.2.5.

10.8.2.7. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.8.2.8. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.8.2.9. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.8.2.10. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.9. Процедура выделения НК из образцов спермы, мокроты и плевральной жидкости.

Для вариантов исполнения «Complex» и «Sputum» набора «НК-сорбент».

10.9.1. Подготовка образцов к экстракции НК.

Для предварительной обработки образцов спермы, мокроты и плевральной жидкости использовать «Комплект для разжижения мокроты».

10.9.1.1. Приготовить раствор NALC следующего состава (из расчета на 10 мл):

50,0 мг АЦЦ

5 мл раствора NaOH

5 мл раствора цитрата натрия

Раствор готовится в день использования (раствор не хранится!)

10.9.1.2. Подготовить и промаркировать чистые пробирки объемом 2 мл по числу образцов.

10.9.1.3. Перенести 0,5 – 1,0 мл исследуемого образца в соответствующую чистую пробирку.

10.9.1.4. К исследуемым образцам в пробирках добавить равный объем раствора NALC, перемешать вортексированием в течение 5-20 сек.

10.9.1.5. Инкубировать пробирки 15 мин при комнатной температуре.

10.9.1.6. Отцентрифугировать пробирки в течение 15 минут при 13000 об/мин на микроцентрифуге, удалить надосадочный раствор отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой.

10.9.2. Экстракция НК.

Экстракцию НК из предварительно обработанных образцов спермы, мокроты и плевральной жидкости проводить с использованием комплектации «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.9.2.1. Добавить в пробирки с предварительно обработанными образцами (п. 8.9.1.6) по 450 мкл раствора 1 и по 10 мкл ЭВК, перемешать до полного растворения осадка вортексированием или пипетированием, используя отдельные наконечники для каждого образца.

10.9.2.2. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.9.2.3. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.9.2.4. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.9.2.5. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.9.2.6. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.9.2.7. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.9.2.8. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.9.2.9. Повторить п. 10.9.2.8.

10.9.2.10. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.9.2.11. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.9.2.12. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.9.2.13. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.10. Процедура выделения НК из образцов биопсийного материала (тканей).

Для вариантов исполнения «Complex» и «Tissue» набора «НК-сорбент».

10.10.1. Подготовка образцов к экстракции НК.

Для предварительной обработки образцов биопсийного материала (тканей) использовать «Комплект для лизиса тканей».

10.10.1.1. При первом использовании комплекта: приготовить раствор протеиназы К, для чего добавить 1 мл раствора для разведения протеиназы К в пробирку с сухой протеиназой К. Содержимое пробирки тщательно перемешать вортексированием до полного растворения протеиназы К.

Готовый раствор протеиназы К хранить при температуре -18...-20°C!

При повторном использовании комплекта: разморозить содержимое пробирки с раствором протеиназы К, раствор перемешать вортексированием, отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе.

10.10.1.2. В пробирки на 1,5 мл с образцами биоптата добавить по 100 мкл лизирующего раствора, по 10 мкл раствора протеиназы К и инкубировать, периодически встряхивая, при 55°C до полного растворения ткани.

Процесс занимает от 2 до 4 часов, при необходимости инкубацию можно проводить в течение ночи при 37° С.

10.10.1.3. Осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием на вортексе.

10.10.2. Экстракция НК.

Экстракцию НК из предварительно обработанных образцов тканей проводить с использованием комплектации «Base» набора **НК-сорбент**.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8 градусов) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.10.2.1. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.10.2.2. В пробирки на 1,5 мл внести по 450 мкл раствора 1.

10.10.2.3. Внести в каждую пробирку по 100 мкл соответствующего образца биоптата, прошедшего обработку лизирующим раствором (п. 8.10.1.2-3).

10.10.2.4. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.10.2.5. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.10.2.6. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.10.2.7. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.10.2.8. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.10.2.9. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.10.2.10. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.10.2.11. Повторить п. 10.10.2.10.

10.10.2.12. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.10.2.13. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.10.2.14. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.10.2.15. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.11. Процедура оценки качества выделенной НК.

Для всех вариантов исполнения набора «НК-сорбент».

Оценка качества выделенных препаратов нуклеиновых кислот проводится непосредственно в ПЦР исследованиях и не требует проведения никаких дополнительных анализов, подтверждающих чистоту (качество очистки) препарата НК.

Для исследования выделенных проб НК рекомендуется использовать любые зарегистрированные ПЦР-наборы, предназначенные для диагностики инфекционных заболеваний и наследственных особенностей организма, и проводить анализ в соответствии с инструкцией к ПЦР-набору. При использовании ПЦР-наборов производства ООО НПФ «Литех» с детекцией результата в реальном времени, качество выделенной НК следует оценивать по результатам анализа внутреннего контроля (геномная ДНК человека). Сигнал выявления внутреннего контроля не должен превышать конечный цикл, указанный в инструкции к ПЦР-набору), в случае использования ЭВК при выделении образца конечный цикл не должен превышать 30.

В случае получения неудовлетворительных результатов оценки качества препарата НК (сигнал, соответствующий внутреннему контролю выявляется позже конечного цикла или не выявляется совсем) рекомендуется исключить ошибки на преаналитическом этапе исследования или на этапе забора материала, убедиться в использовании соответствующего клиническому образцу варианта исполнения набора и комплекта для предобработки материала, провести выделение образца в точном соответствии с инструкцией, провести обучение персонала по работе с набором с помощью специалистов ООО НПФ «Литех».

При соблюдении всех требований настоящей инструкции набор **НК-сорбент** позволяет получить препарат НК хорошего качества очистки (чистоты), достаточного для последующего проведения исследований методами ПЦР.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.1. Условия хранения

11.1.1. Все варианты исполнения набора реагентов **НК-сорбент** должны храниться при температуре плюс 2-8°C в течение всего срока годности. Срок годности комплектов – 12 месяцев.

11.1.2. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

11.2. Транспортирование

11.2.1. Набор реагентов **НК-сорбент** транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в отапливаемых герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом, (условия транспортирования соответствуют условиям хранения) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств.

11.2.2. Для всех вариантов исполнения набора **НК-сорбент** допустима транспортировка при температуре от плюс 18 до 25 °C в течение 5 дней (не более).

11.2.3. Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

11.3. Эксплуатация набора

11.3.1. Набор реагентов **НК-сорбент** должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению.

11.3.2. Варианты исполнения «Complex», «Sputum», «Tissue» набора **НК-сорбент** содержат компоненты, предназначенные для предварительного приготовления растворов, непосредственно используемых при выделении НК:

- все реагенты «Комплекта для разжижения мокроты» предназначены для приготовления раствора NALC, используемого при проведении экстракции НК из образцов мокроты, плевральной жидкости, спермы. Приготовление раствора NALC проводить согласно действующей версии утверждённой инструкции. Раствор готовится в день использования и хранению не подлежит.

- реагенты «Комплекта для лизиса тканей» раствор для разведения протеиназы К и протеиназа К предназначены для приготовления раствора протеиназы К, используемого при проведении экстракции НК из образцов биопсийного материала (тканей). Приготовление раствора протеиназы К проводить согласно действующей версии утверждённой инструкции.

Готовый раствор протеиназы К хранить при температуре $-18...-20^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока эксплуатации набора.

11.3.3. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

12. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Отходы биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные отходы) из клинично-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, образцы материала после пробоподготовки (выделение НК) и отходы после проведения амплификации относятся к классу Б (эпидемически опасные отходы).

Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции) /обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

13. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора **НК-сорбент** следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

Рук. производственно-технического центра
ООО НПФ «Литех»

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



Т.В.Парфенова



П.К. Варнавичус

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 28 ЛИСТОВ

«06» ноября 2019 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус Н.К.



Прошито, проверено,
скреплено печатью.
Количество листов
28 шт.

Директор
Наумов А.Ю.

