

НК-ВЕТ

Набор реагентов для экстракции ДНК/РНК из биологического материала животных, продуктов питания и объектов окружающей среды (НК-ВЕТ)

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Только для исследовательских целей

Форма 1 **REF** E011-1  48

Форма 2 **REF** E011-2  96

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
2 ФОРМЫ ВЫПУСКА	4
3 СОСТАВ.....	5
4 ПРИНЦИП МЕТОДА.....	6
5 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	6
6 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	7
7 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	9
8 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	16
8.1 Экстракция НК при использовании формы выпуска 1 (автоматическая методика с использованием автоматической станции «Amplitech E1»)	16
8.1.1 Подготовка реагентов.....	16
8.1.2 Внесение образцов и запуск протокола в работу	16
8.2 Экстракция НК при использовании формы выпуска 2 (автоматическая методика с использованием процессора магнитных частиц KingFisher™)	17
8.2.1 Подготовка реагентов.....	17
8.2.2 Подготовка глубоколоночных планшетов.....	17
8.2.3 Загрузка протокола экстракции.....	18
8.2.4 Внесение образцов и запуск протокола в работу	18
8.3 Экстракция НК при использовании формы выпуска 2 (ручная методика с использованием магнитного штатива или центрифугирования)	18
8.3.1 Подготовка реагентов.....	18
8.3.2 Проведение экстракции НК с использованием центрифугирования.....	19
8.3.3 Проведение экстракции НК с использованием магнитного штатива	20
8.4 Хранение очищенных НК	21
9 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.....	21
9.1 Контроли, используемые этапе экстракции НК	21
9.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации	22
10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	22
10.1 Срок годности	22
10.2 Хранение.....	22
10.3 Транспортирование.....	22
10.4 Эксплуатация.....	22
11 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ.....	22
12 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	23
13 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА.....	23
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	23

ВВЕДЕНИЕ

Настоящая инструкция по применению версии 12.03.24 распространяется на изделие «Набор реагентов для экстракции ДНК/РНК из биологического материала животных, продуктов питания и объектов окружающей среды (НК-ВЕТ)» (далее – набор). Данный набор реагентов не является медицинским изделием и не предназначен для использования в лабораторной диагностике *in vitro* заболеваний человека.

Краткое наименование набора: НК-ВЕТ.

Набор следует применять в соответствии с действующей версией инструкции по применению. Для удобства работы в лаборатории допускается использовать действующую версию краткого руководства по применению набора.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для экстракции тотальных ДНК/РНК из биологического материала от животных, продуктов питания и объектов окружающей среды для последующего исследования методом ПЦР.

Для проведения экстракции НК с помощью набора следует использовать следующие виды исследуемого материала:

- цельная кровь, плазма крови, сыворотка крови, лейкоциты крови;
- мокрота, слюна, мазки из респираторного тракта;
- спинномозговая жидкость (ликвор); асцитическая жидкость, содержимое бурс и гигром;
- фекалии, помет птиц, меконий, ректальные мазки, мазки из клоаки, моча;
- содержимое желудка / брюшной полости;
- сперма, яйца, куриные эмбрионы, аллантаисная жидкость; амниотическая жидкость; молоко;
- тканевой материал животных (в том числе ушные выщипы, патологический материал);
- суспензии насекомых, клещей (и других животных типа Членистоногие);
- волосяные луковицы, перья птиц
- продукты питания животного происхождения и корма растительного и животного происхождения (кормовые добавки, комбикорма, текстураты, мясокостная мука, консервы, полуфабрикаты);
- культуры микроорганизмов и культуры клеток животных;
- смывы с объектов окружающей среды, почва.

Набор может применяться в зависимости от его формы выпуска для экстракции НК совместно с автоматическими станциями «Amplitech E1» (ООО «Амплитек») и KingFisher™ (Thermo Fisher Scientific, Финляндия), а также для ручной методики экстракции НК с использованием магнитного штатива или центрифуги.

2 ФОРМЫ ВЫПУСКА

Набор выпускается в двух формах¹ (см. таблицу 1).

Таблица 1

Описание форм выпуска набора

Форма	Описание	Количество исследований, в том числе для контролей
1	Для проведения экстракции НК с применением автоматической методики с использованием автоматической станции пробоподготовки «Amplitech E1» (ООО «Амплитек»).	48
2	Для проведения экстракции НК с применением: - ручной методики с использованием центрифугирования, - ручной методики с использованием магнитного штатива, - автоматической методики с использованием процессора магнитных частиц KingFisher™ (Thermo Fisher Scientific, Финляндия).	96

¹ Набор в форме выпуска 1 упакован в коробку из картона, в форме выпуска 2 - в полиэтиленовый пакет с застёжкой Zip-Lock.

3 СОСТАВ

Состав набора указан в таблицах 2, 3 и 4.

Таблица 2

Состав формы 1

Компонент	Количество	Внешний вид
Картридж с реагентами НК-ВЕТ	2 шт.	96-луночные планшеты с реагентами, запаянные фольгированной плёнкой
Одноразовые наконечники	48 шт.	Наконечники с фильтром
Одноразовые пробирки	48 шт.	Стрипованные или индивидуальные пробирки
Плёнки для картриджа	4 шт.	Клейкие плёнки
Инструкция по применению	1 шт.	В электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

Таблица 3

Расположение и объём реагентов в картридже, входящем в состав формы 1


Ряды ячеек	Реагент	Номинальный объём в ячейке, мл	Внешний вид	
A, E	Буфер D1 (Раствор для лизиса)	 Опасно ³	0,40	Прозрачная бесцветная жидкость
B, F	Реагент МЕР (Магнетизированная силика)		0,30	Суспензия ⁴ от рыжего до чёрного цвета
C, G	Буфер D2 (Раствор для отмывки)	 Опасно ³	0,70	Прозрачная бесцветная жидкость
D, H	Буфер D3 (Раствор для элюции)		1,10	Прозрачная бесцветная жидкость

Таблица 4

Состав формы 2

Компонент	Номинальный объём, мл	Количество	Внешний вид	
Буфер D1 (Раствор для лизиса)	 Опасно ³	48,0	1 флакон	Прозрачная бесцветная жидкость
Реагент МР (Магнетизированная силика)		0,96	1 пробирка	Суспензия ⁴ от рыжего до чёрного цвета
Буфер D2 (Раствор для отмывки)	 Опасно ³	48,0	1 флакон	Прозрачная бесцветная жидкость
Буфер D3 (Раствор для элюции)		106,0	1 флакон	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	–	1 шт.		В электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	–	1 шт.		В бумажном виде
Паспорт	–	1 шт.		В электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/
Протокол экстракции «NA100-KF»	–	1 шт.		В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/

² В случае отсутствия доступа к Интернету обратитесь в службу технической поддержки по телефону (495) 374-13-46 для запроса о предоставлении бумажной версии паспорта.

³ Реагенты содержат химически опасные вещества, информацию по которым см. в разделе 9.

⁴ В процессе хранения возможно оседание магнетизированной силики, вследствие чего образуется осадок от рыжего до чёрного цвета в прозрачном растворе.

4 ПРИНЦИП МЕТОДА

Экстракция НК проводится методом магнитной сепарации. Процедура экстракции НК включает:

- обработку исследуемого образца лизирующим раствором,
- связывание НК с частицами магнитного сорбента (магнетизированной силики),
- удаление других компонентов лизированного биологического материала последующими отмывками сорбента при осаждении магнитного сорбента с НК под действием постоянного магнитного поля или с использованием центрифуги,
- элюцию НК при добавлении раствора для элюции к магнитному сорбенту.

5 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором требуются оборудование и материалы, указанные в таблице 5.

Таблица 5

Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором

Форма выпуска	Необходимое оборудование и материалы
ВНИМАНИЕ! При работе с набором следует использовать только одноразовые пробирки и наконечники, сертифицированные на отсутствие ДНКаз и РНКаз.	
Форма 1	<ul style="list-style-type: none">• бокс микробиологической безопасности класс II (тип А);• автоматическая станция пробоподготовки «Amplitech E1» (ООО «Амплитек», Россия; РУ № РЗН 2022/16981);• центрифуга-вортекс (РУ № ФС № 2005/518);• дозаторы переменного объёма, механические или электронные, с возможностью дозирования от 10 до 100 мкл (РУ № ФСР 2009/05681);• штатив для пробирок объёмом 2,0 мл;• холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С;• наконечники для дозаторов переменного объёма, с фильтром, объёмом до 10 и 100 мкл, одноразовые, свободные от ДНКаз и РНКаз;• контейнеры для элюата согласно требованиям, указанным в руководстве по эксплуатации автоматической станции «Amplitech E1»;• ёмкость для сброса и инактивации использованных материалов;• перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.
Автоматическая методика экстракции	
Форма 2	<ul style="list-style-type: none">• бокс микробиологической безопасности класс II (тип А);• процессор магнитных частиц для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков KingFisher™ и расходные материалы к нему (Thermo Fisher Scientific, Финляндия; РУ № ФСЗ 2009/05562);• центрифуга-вортекс (РУ № ФС № 2005/518);• дозаторы переменного объёма, механические или электронные, с возможностью дозирования от 100 до 1000 мкл (РУ № ФСР 2009/05681);• штатив для пробирок объёмом 2,0 мл;• холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С;• наконечники для дозаторов переменного объёма, с фильтром, объёмом до 100 и 1000 мкл, одноразовые, свободные от ДНКаз и РНКаз;• ёмкость для сброса и инактивации использованных материалов;• перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.
Ручная методика экстракции	
	<ul style="list-style-type: none">• бокс микробиологической безопасности класс II (тип А);• центрифуга-вортекс (РУ № ФС № 2005/518);• микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объёмом 1,5 мл с ускорением не менее 10000 x g (РУ № ФСЗ 20212/13316) или магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объёмом 1,5 мл (РУ № РЗН 2022/16360) (в зависимости от выбранной ручной методики);

Форма выпуска	Необходимое оборудование и материалы
	<ul style="list-style-type: none"> • термостат для пробирок типа «Эппендорф» объёмом 1,5 мл с возможностью нагрева не менее чем до 80 °С (ПУ № ФС № 2005/519); • вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой (ПУ № ФСР 2010/08928); • дозаторы переменного объёма, механические или электронные, с возможностью дозирования от 100 до 1000 мкл (ПУ № ФСР 2009/05681); • штатив для пробирок объёмом 1,5 и 2,0 мл; • холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С; • микроцентрифужные пробирки объёмом 1,5 мл с крышками, одноразовые, свободные от ДНКаз и РНКаз; • наконечники для дозаторов переменного объёма, с фильтром, объёмом до 100 и 1000 мкл, одноразовые, свободные от ДНКаз и РНКаз; • наконечники для дозаторов переменного объёма, без фильтра, объёмом до 200 мкл, одноразовые; • ёмкость для сброса и инактивации использованных материалов; • перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.

6 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Класс потенциального риска применения набора (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ № 4н от 06.06.2012) – 2б.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, а также определения видового состава пищевого сырья и продуктов питания с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» 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 необходимо всегда выполнять следующие требования:

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов исследования.
- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21 (раздел IV).
- Утилизировать реагенты, входящие в состав формы 2, и плёнки для картриджа, входящие в состав формы 1, (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения), одноразовые наконечники и одноразовые пробирки, картриджи, входящие в состав формы 1, (неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения,

транспортирования и применения), внешнюю упаковку набора, эксплуатационную документацию в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» к утилизации медицинских отходов класса Г.

- Утилизировать биологический материал, картриджи с внесёнными образцами, а также загрязнённые биологическим материалом расходные материалы (в том числе одноразовые наконечники и пробирки, входящие в состав набора) и инструменты в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 к утилизации медицинских отходов класса Б.

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию, указанному в таблицах 2-4 для соответствующей формы выпуска набора.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать отдельный для каждого образца/реагента одноразовый наконечник с фильтром или без фильтра (при удалении надсадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя).

- Использовать защитную одежду в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Все операции проводить только в одноразовых неопудренных перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать вдыхания паров, контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

Реагент МР, Реагент МЕР и Буфер D3 содержат натрия азид в концентрации не более 0,05 %, поэтому не классифицируются как химически опасные для здоровья человека и окружающей среды. При контакте немедленно промыть поражённое место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

Буфер D1 и Буфер D2 классифицируются как химически опасные. Вещества, которые повлияли на их классификацию, а также коды заявлений об опасности и мер предосторожности, требуемых при работе с данными реагентами, приведены в таблице 6. Расшифровка кодов представлена в таблице 7. Листы безопасности реагентов доступны по запросу.

Таблица 6

Информация о химически опасных реагентах, входящих в состав набора

Реагент	Опасные вещества ⁵	Код заявления об опасности	Код меры предосторожности
---------	-------------------------------	----------------------------	---------------------------

⁵ Буфер D1 и Буфер D2 содержат натрия азид в концентрации (не более 0,05 %), не влияющей на классификацию данных реагентов как химически опасных.

Буфер D1	Гуанидин гидрохлорид, гуанидин изотиоцианат, изопропанол, 1-тиоглицерол	H225, H302, H314, H319, H332, H336, H412, EUH032	P210, P241, P242, P243, P261, P264, P270, P271, P273, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340+P312, P305+P351+P338, P332+P313, P337+P313, P363, P370+P378, P403+P233, P501
Буфер D2	Гуанидин изотиоцианат, изопропанол	H225, H302, H314, H319, H336, H412, EUH032	

Таблица 7

Расшифровка кодов заявлений об опасности и мер предосторожности

Заявления об опасности	
H225: Легковоспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси.	H332: Вредно при вдыхании.
H302: Вредно при проглатывании.	H336: Может вызывать сонливость или головокружение.
H314: При попадании на кожу и в глаза вызывает химические ожоги.	H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.
H319: При попадании в глаза вызывает серьёзное раздражение.	EUH032: При контакте с кислотами освобождаются очень токсичные газы.
Меры предосторожности	
P210: Беречь от источников воспламенения/нагрева/искр/открытого огня. Не курить.	P304+P340+P312: ПРИ ВДЫХАНИИ: Свежий воздух, покой. Обратиться за медицинской помощью при плохом самочувствии.
P241: Использовать взрывобезопасное оборудование и освещение.	P305+P351+P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. При наличии контактных линз снять их и продолжить промывание водой.
P242: Использовать искробезопасные инструменты.	P332+P313: При раздражении кожи: обратиться за медицинской консультацией.
P243: Беречь от статического электричества.	P337+P313: Если раздражение глаз не проходит, обратиться за медицинской консультацией.
P261: Избегать вдыхания паров.	P363: Перед повторным использованием выстирать загрязнённую одежду.
P264: Вымыть тщательно руки после работы.	P370+P378: В случае пожара: Использовать огнетушитель для тушения.
P270: Не есть, не пить и не курить в процессе использования этого продукта.	P403+P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой упаковке.
P271: Использовать только на открытом воздухе или в хорошо вентилируемом помещении.	P501: Утилизировать содержимое в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.
P273: Избегать попадания в окружающую среду.	
P280: Использовать перчатки, спецодежду и средства защиты глаз.	
P301+P330+P331: ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: Прополоскать рот. Не вызывать рвоту!	
P303+P361+P353: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): Немедленно снять всю загрязнённую одежду. Промыть кожу водой или принять душ.	

Использование набора по назначению и соблюдение вышеперечисленных мер предосторожности исключает негативное воздействие на организм человека.

7 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Взятие, предварительную обработку, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с требованиями, перечисленными в таблицах 8 и 9, несоблюдение которых может привести к получению некорректных результатов исследования.

Таблица 8

Требования к взятию и предварительной обработке исследуемого материала

Взятие цельной крови
Взятие венозной крови проводится после длительного голодания (не менее 6 часов) в пробирку с антикоагулянтом (раствором ЭДТА или цитрата натрия), либо с активатором свертывания крови. ВНИМАНИЕ! Недопустимо использовать гепарин в качестве антикоагулянта. Тщательно перемешать кровь с антикоагулянтом, несколько раз перевернув пробирку.

Предобработка цельной крови для получения лейкоцитарной массы

Пробирки с цельной кровью центрифугировать при 800 – 1600g (3000 об./мин) в течение 20 мин. при комнатной температуре. Удалить плазму и используя наконечник с фильтром, аккуратно собрать клетки крови (лейкоцитарную массу) с поверхности осадка в объеме 200 мкл. Перенести клетки в стерильную пробирку объемом 1,5 – 2,0 мл.

Предобработка цельной крови для получения плазмы

Пробирки с цельной кровью центрифугировать 20 минут при 800 – 1600g (3000 об./мин) при комнатной температуре. Затем отобрать плазму в количестве не менее 1 мл с использованием отдельного для каждого образца наконечника с фильтром в стерильную пробирку объемом 1,5 – 2,0 мл.

Предобработка цельной крови для получения сыворотки

Пробирки с цельной кровью без антикоагулянта отстаивают при комнатной температуре в течение 30 минут до полного образования сгустка, затем центрифугируют 10 минут при 800–1600g. Полученную сыворотку отбирают в количестве не менее 1 мл с использованием отдельного для каждого образца наконечника с фильтром в стерильную пробирку объемом 1,5 – 2,0 мл.

Взятие мазков из респираторного тракта, слюны

Взятие материала со слизистых респираторного тракта проводится из полости носа, с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки с помощью стерильного зонда-тампона в пробирку с транспортной средой, при необходимости предварительно обработав места поражения от гноя марлевым тампоном.

Сбор и предобработка мочи

Мочу получают во время мочеиспускания, надавливанием на мочевого пузырь, путем катетеризации, а также с помощью пункции мочевого пузыря (уроцистоцентез). Мочу после сбора отстаивают в течение 1 часа, затем осторожно сливают, оставляя придонную часть с осадком – около 10 мл.

Предобработка

Флакон с мочой взболтать. Перенести 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугируют 5 мин при 10 000 g. При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл физиологического раствора стерильного или транспортной среды и затем снова концентрировать.

Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить супернатант, используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра, не захватывая осадок. К осадку добавить 200 мкл физиологического раствора стерильного или транспортную среду в объеме, указанном в инструкции по ее применению. Тщательно перемешать содержимое на вортексе.

Взятие и предобработка помета птиц, фекалий, мекония

Использовать пробы фекалий (помет), мекония массой (объемом) примерно 1–3 г (1–3 мл). Перенести пробу в количестве 1 г (1 мл) отдельным наконечником с фильтром или одноразовым шпательом в стерильный контейнер.

Предобработка:

В пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,8 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида), отдельным наконечником с фильтром (или одноразовой лопаткой) внести 0,1 г (0,1 мл) фекалий/помета/мекония и тщательно ресуспендировать на вортексе до образования гомогенной суспензии.

При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к приготовленной суспензии фекалий добавить глицерин в конечной концентрации 10–15 %. После тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30–40 мин пробы заморозить.

Взятие ректальных мазков, мазков из клоаки

Взятие материала провести путем введения зонда в задний проход (клоаку) на глубину 4 – 5 см, аккуратно вращая зонд вокруг оси, собрать материал на зонд, осторожно извлечь зонд. Перенести зонд в пробирку с транспортной средой.

Взятие и предобработка содержимого желудка/брюшной полости

Содержимое брюшной полости и желудка отбирают с помощью стерильного шприца с иглой большого диаметра в объеме 10 – 20 мл. Затем переносят в стерильные пластиковые пробирки или контейнеры.

Предобработка:

Исследуемый материал в объеме 10 мл центрифугируют при 2000 g в течение 10-15 минут. При необходимости объем проб доводят до требуемого путем добавления физиологического раствора. Супернатант осторожно сливают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости.

Если осадок практически не виден, то в эту же пробирку вносят еще 10 мл материала и повторяют центрифугирование. Осадок суспендируют в оставшейся надосадочной жидкости, переносят в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл, и 100 мкл суспензии используют для экстракции.

Взятие асцитической жидкости

Полученная при пункции жидкость отбирается в стерильный контейнер объемом 60 мл. При этом центрифугирование не требуется. Для исследования отбирают жидкость без сгустков.

Взятие спинномозговой жидкости (ликвора)

Спинномозговую жидкость (ликвор) собирают с помощью одноразовых игл в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл в количестве не менее 1,0 мл.

Взятие содержимого бурс, гигром

Забор содержимого гигром, бурс проводят стерильным шприцем с иглой большого диаметра. Делают пункцию, забирают содержимое гигромы (бурсы) и переносят его в стерильный контейнер либо пластиковые пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл в количестве не менее 1,0 мл.

Взятие и предобработка спермы

Забор спермы осуществляется мануальным способом. Сперму отбирают в объеме 0,5 – 2,0 мл в стерильные пробирки. Для дальнейшего использования и сохранности биоматериала сперму охлаждают до 4 – 6°С.

Непосредственно перед выделением нуклеиновых кислот, используя наконечник с фильтром, переносят 50 мкл спермы в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл и добавляют 150 мкл транспортной среды, тщательно перемешивают пробу на вортексе.

Отбор яиц, куриных эмбрионов

Отбор проб яиц проводят по ГОСТ 31654 и ГОСТ 31655. Отбор и подготовку лабораторных проб яичных продуктов проводят по ГОСТ 31720. Отбор проб проводят в чистую стеклянную или пластиковую посуду или одноразовые пластиковые пакеты.

Пробоподготовка проб яиц:

Яйца в скорлупе разбивают и осторожно, не повреждая желток, отделяют основную массу яичного белка. Оставшиеся желтки тщательно перемешивают или гомогенизируют до однородной массы, не допуская вспенивания.

Отбирают 1,0 мл пробы, помещают в одноразовую пластиковую пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл, маркируют и хранят до и после проведения анализа.

Взятие аллантаической жидкости

Для получения аллантаической жидкости в скорлупе куриных эмбрионов прокалывают отверстие и отбирают стерильным шприцем в пробирку объемом 1,5 мл 1,0–1,5 мл аллантаической жидкости.

Взятие и предобработка амниотической жидкости

Амниотическую жидкость отбирают при помощи стерильного шприца. Исследуемую пробу в количестве 1 мл отдельным наконечником переносят в стерильную пробирку.

Предобработка:

Исследуемый материал тщательно ресуспендируют на вортексе. Отбирают, используя наконечник с фильтром 1 мл материала и переносят в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугируют 10 минут при 10 тыс. g.

После проведения центрифугирования надосадочную жидкость аккуратно отбирают, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 100 мкл жидкости, затем ресуспендируют материал на вортексе.

Взятие и предобработка молока

Молоко отбирают в объеме 30 – 50 мл в стерильную посуду.

Предобработка:

Для исследования образцы концентрируют по одному из двух режимов:

– одномоментно при 6000 об./мин в течение 18 ± 2 мин;

– дробно при 1000 об./мин в течение 5 мин для осаждения крупных частиц и при 6000 об./мин в течение 15 мин.

По окончании центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 5 мл 0,9%-ного фосфатного буферного раствора или физиологический раствор, ресуспендируют и отбирают 1 мл взвеси в пробирку типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 мл. Подготовленные пробы хранению не подлежат.

Взятие и предобработка фрагментов тканей и органов

Кусочки паренхиматозных органов размером 1x1x1 см (печень, легкие, селезенка), трахея, воздухоносные мешки, миндалины, лимфатические узлы, кишечник, семенники с придатками, плацента, плодовые оболочки абортировавших животных, фрагменты пораженных кожных покровов отбирают в стерильные контейнеры.

Предобработка:

Пробы тканей и органов гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят 10% суспензию, используя стерильный физиологический раствор или фосфатный буфер. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 400 г в течение 2 мин. Надосадочную жидкость используют для экстракции НК.

Взятие смывов с объектов окружающей среды

При взятии смывов с поверхности оборудования, приборов, инвентаря, расходных материалов, пользуются стерильными ватными зондами. Записывается номер образца по порядку, место взятия смыва, техническое и санитарное состояние оборудования (приборы, поверхность и т. д.), с которого взят смыв, время забора.

Почва

Навеску образца 200 мг поместить в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.

Предобработка:

Переместить исследуемый материал в стерильную ступку. Гомогенизировать необходимое количество образца в стерильной ступке с пестиком, до получения однородной массы. Перенести 200 мг гомогенного образца из ступки в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.

Примечание: во избежание контаминации после проведения ручной гомогенизации необходимо обрабатывать ступки и пестики дезинфицирующим хлорсодержащим средством.

Предобработка суспензии насекомых, клещей (и других животных типа Членистоногие)

После взятия и доставки материала в лабораторию его обрабатывают диэтиловым эфиром до обездвижения, нанося каплю эфира на ватно-марлевую пробку. После определения вида и пола материал может быть объединен в пулы в зависимости от вида, пола, места и даты сбора, и помещен в сухие чистые пробирки объемом 1,5 мл.

При исследовании на чуму в одну пробу включают по 20–30 (не более 50) блох или вшей. Из кровососущих двукрылых группируют пробы, включая в одну до 100 комаров, до 250 мошек и 20–25 слепней.

При исследовании на арбовирусные инфекции комаров объединяют в пулы по 50–100 экземпляров. При необходимости проводят исследования отдельных особей.

Насекомых помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, куда вносят 1 мл 96 %-го этанола, встряхивают на вортексе и центрифугируют в течение 3–5 с при 2000 г для удаления капель с крышки пробирки. С помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют спирт из пробирки. Вносят в пробирку 1 мл 0,15 М раствора хлорида натрия, встряхивают пробирку и осаждают капли с крышки пробирки на микроцентрифуге в течение 3 – 5 с при 2000 г. С помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют раствор хлорида натрия из пробирки.

Переносят насекомых в стерильную фарфоровую чашку или автоматический гомогенизатор, добавляют 0,7 – 1,0 мл 0,15 М раствора хлорида натрия и гомогенизируют пробу.

Наконечником с фильтром переносят пробу в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 1200 г в течение 2 мин для осветления пробы. РНК и ДНК выделяют из 0,1 мл надосадочной жидкости.

При выделении РНК и ДНК из комаров, блох и вшей используют данную методику обработки проб, за исключением этапов отмывки в 96 %-м этаноле и 0,15 М растворе хлорида натрия. Насекомых сразу гомогенизируют в стерильной ступке или в автоматическом гомогенизаторе в 0,15 М растворе хлорида натрия.

Забор и предобработка волосяных луковиц

При заборе материала важно, чтобы волос был вырван вместе с волосяной луковицей с поверхности кожи. В таком виде волосы транспортируются в чистом бумажном конверте, либо пакете с застежкой Zip-Lock.

Для проведения исследования промывают волос в деионизированной воде, стерильным скальпелем отрезают луковицу с фрагментом стержня длиной около 1 см и помещают образец в полипропиленовую пробирку объемом 1,5 мл.

Взятие пера птиц

Перо для исследования должно быть выдернуто (перья, выпавшие в результате линьки, не пригодны). Особенно много ДНК выделяется из молодых, растущих (“кровяных”) перьев. При отправке на анализ следует следить, чтобы не произошло загрязнения образца чужеродной ДНК, перья от разных птиц следует разложить в отдельные конверты и подписать их. В таком виде они могут сохраняться весьма долго при комнатной температуре. Таким образом, можно посылать образцы на довольно большое расстояние.

Для исследования используется фрагмент пера длиной 0,3–0,5 см.

Взятие и предобработка продуктов питания животного и растительного происхождения, кормов

Продукты животного происхождения (куски мяса, фарш, мясные полуфабрикаты и т.п.) отбирают в стерильные контейнеры. Отбор образцов продукции проводят по национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп сырья, пищевых продуктов и кормов.

Предобработка:

Навеску исследуемых образцов массой не менее 100 мг растирают пестиком в ступке до гомогенного состояния, используя фосфатный буфер или физиологический раствор. Гомогенизацию образцов плотных продуктов рекомендуется проводить с использованием автоматических гомогенизаторов и сопутствующих расходных материалов.

В чистые промаркированные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл отобрать 1,2 мл полученной суспензии. Центрифугировать пробирки с исследуемыми образцами при 3 000 г в течение 5 мин.

Взятие культур микроорганизмов и культур клеток животных

Культуры микроорганизмов: колонии отбирают с помощью стерильной бактериологической петли в пробирку с транспортной средой, стерильным физиологическим раствором или стерильной дистиллированной водой объемом 500 мкл, а затем перемешивают.

Культуры клеток животных (инфицированные культуры клеток): в зависимости от тропизма возбудителя, отбирают либо культуральную жидкость, либо суспензию клеток.

Таблица 9

Требования к условиям транспортирования и хранения исследуемого материала

Условия транспортирования и хранения

Цельная кровь

Допускается хранение образцов цельной крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов с момента получения материала;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 2 суток.

ВНИМАНИЕ! Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

Лейкоцитарная масса

Допускается длительное хранение образцов лейкоцитарной массы до проведения ПЦР-исследования при температуре не выше минус 68 °С.

Плазма крови

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Сыворотка крови

Допускается хранение образцов сыворотки крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Мазки из респираторного тракта, слюна

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Слюну отбирают не менее 1 мл в одноразовую стерильную пробирку объемом 2,0 мл, либо в контейнер с завинчивающейся крышкой без транспортной среды.

Допускается хранение образцов мазков и слюны до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Моча

В случае если сбор мочи осуществляется в емкость без реагентов для консервации и стабилизации, допускается хранение и транспортирование образцов мочи до проведения предобработки:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

При осуществлении сбора мочи в емкость с транспортной средой или реагентами для консервации и стабилизации, хранение образцов мочи до проведения предобработки проводить согласно инструкции к используемой емкости для сбора.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия хранения предварительно обработанных проб аналогичны условиям хранения материала до предобработки.

Помет птиц, фекалии, меконий

Условия хранения и перевозки образцов:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток.

Условия хранения предварительно обработанных проб:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Ректальные мазки, мазки из клоаки

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Содержимое желудка/брюшной полости

Допускается хранение образцов до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала

Асцитическая жидкость

Допускается хранение образцов жидкости до проведения ПЦР-исследования:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Спинальная жидкость (ликвор)

Допускается хранение образцов ликвора до проведения ПЦР-исследования:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Содержимое бурс, гигром

Допускается хранение образцов до проведения ПЦР-исследования:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Сперма

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Яйца, куриные эмбрионы

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Аллантоисная жидкость

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели.

Амниотическая жидкость

Образцы исследуемого материала хранят при следующих условиях:

- при температуре 2 – 8 °С – в течение 3 суток (цельную кровь допускается хранить при данной температуре в течение 7 суток);
- при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание исследуемых образцов.

Молоко

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Предобработанные пробы хранению не подлежат.

Фрагменты тканей и органов

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Смывы с объектов окружающей среды

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Почва

Перевозка материала осуществляется без особых условий.

Условия хранения предварительно обработанных проб:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Суспензии насекомых, клещей (и других животных типа Членистоногие)

Условия хранения материала и предварительно обработанных проб:

- при температуре минус 20 °С – в течение 1 месяца.
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Волосьяные луковицы

Перевозка материала осуществляется без особых условий.

Условия хранения предварительно обработанных проб:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Перья птиц

Условия хранения предварительно обработанных проб:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Продукты питания животного и растительного происхождения, корма

Допускается хранение образцов до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

8 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

8.1 Экстракция НК при использовании формы выпуска 1 (автоматическая методика с использованием автоматической станции «Amplitech E1»)

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо ознакомиться с руководством по эксплуатации автоматической станции «Amplitech E1».

ВНИМАНИЕ! Для внесения в ячейки картриджа исследуемых и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтром для каждого образца.

8.1.1 Подготовка реагентов

8.1.1.1 Подготовить контрольные образцы (например, внутренний контроль (ВК), положительный контроль (ПК), отрицательный контроль (ОК)), входящие в состав набора реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР и используемые со стадии экстракции, согласно инструкции по его применению.

8.1.1.2 Проколоть защитную фольгированную плёнку необходимого количества ячеек картриджа в рядах А и/или Е с использованием специализированного перфоратора (входит в комплект поставки станции «Amplitech E1») для последующего внесения исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! В картридже с ранее вскрытыми и использованными для экстракции ячейками необходимо заклеить данные ячейки клейкой плёнкой, входящей в состав набора, разрезав её по нанесённым линиям.

ВНИМАНИЕ! Исследуемые образцы, ВК и контроли (ПК, ОК) должны быть внесены в ячейки картриджа не позднее чем через два часа после вскрытия ячеек.

8.1.2 Внесение образцов и запуск протокола в работу

8.1.2.1 Внести во вскрытые (проколотые) ячейки картриджа рядов А/Е по 10 мкл ВК.

8.1.2.2 Добавить в ячейки с уже внесённым ВК исследуемые⁶ и контрольные образцы в объёме 100 мкл, используя для каждого образца отдельный наконечник. Каждый образец должен быть внесён в отдельную ячейку картриджа.

ВНИМАНИЕ! Во избежание получения невалидных результатов, не допускается внесение в ячейки картриджа исследуемых образцов, содержащих сгустки, слизь, твёрдые частицы и другие примеси, способные закупорить одноразовые наконечники автоматической станции.

ВНИМАНИЕ! После внесения исследуемых, контрольных образцов и ВК процедура экстракции на автоматической станции должна быть запущена в течение 20 мин.

8.1.2.3 Разместить на рабочем столе автоматической станции согласно руководству по её применению: картридж с внесёнными исследуемыми образцами и контролями, необходимое количество одноразовых наконечников и пробирок, входящих в состав набора, а также используемые контейнеры для элюата.

⁶ Для образцов цельной крови, мокроты и фекалий необходимо провести предобработку согласно разделу 10.

8.1.2.4 Запустить выполнение протокола экстракции НК согласно руководству по эксплуатации автоматической станции «Amplitech E1» с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «НК-ВЕТ».

Примечание – Объем элюции (от 100 до 200 мкл) указать в протоколе в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР.

8.1.2.5 Надосадочная жидкость в контейнерах для элюата, полученная в результате автоматической экстракции, содержит очищенные НК, которые можно использовать для постановки реакции ОТ и/или ПЦР.

8.2 Экстракция НК при использовании формы выпуска 2 (автоматическая методика с использованием процессора магнитных частиц KingFisher™)

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо ознакомиться с инструкцией по эксплуатации процессора KingFisher™.

ВНИМАНИЕ! Для внесения в лунки планшета реагентов, исследуемых и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтром для каждого реагента/образца.

8.2.1 Подготовка реагентов

8.2.1.1 Перемешать тщательно взбалтыванием Буфер D1, Буфер D2, Буфер D3.

8.2.1.2 Подготовить контрольные образцы (например, внутренний контроль (ВК), положительный контроль (ПК), отрицательный контроль (ОК)), входящие в состав набора реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР и используемые со стадии экстракции, согласно инструкции по его применению.

8.2.1.3 Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с Реагентом МР на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную, без центрифугирования.

8.2.1.4 Внести всё содержимое пробирки с Реагентом МР и ВК, если он включён в состав набора реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР, в Буфер D1. Полученную смесь тщательно перемешать взбалтыванием. Смесь допускается хранить не более 10 дней при температуре от 2 °С до 8 °С.

8.2.2 Подготовка глубоколоночных планшетов

Перед проведением автоматической экстракции с использованием процессора KingFisher™ необходимо разнести реагенты, входящие в состав данного набора, по глубоколоночным планшетам, совместимым с прибором. Для этого необходимо выполнить порядок действий, указанный ниже.

8.2.2.1 Промаркировать 5 глубоколоночных планшетов: D1, D2, D3, Э, Гр.

8.2.2.2 В лунки планшета D1 внести по 500 мкл подготовленной смеси ВК, Реагента МР и Буфера D1.

8.2.2.3 В лунки планшета D2 внести по 500 мкл Буфера D2.

8.2.2.4 В лунки планшета D3 внести по 900 мкл Буфера D3.

8.2.2.5 В лунки планшета Э внести от 100 до 200 мкл Буфера D3.

Примечание - Требуемый объем Буфера D3 (объем элюции) см. в инструкции к используемому набору реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Не допускается хранение планшета Э в открытом виде во избежание испарения Буфера D3 и уменьшения объема реагента в ячейках.

8.2.2.6 В планшет Гр поместить насадку на магнитную голову KingFisher™.

8.2.3 Загрузка протокола экстракции

Для проведения экстракции НК с использованием процессора магнитных частиц KingFisher™ необходимо использовать протокол экстракции «NA100-KF», расположенный по адресу: <http://www.amplitech.ru/resources/>. Загрузка протокола в программное обеспечение «Thermo Scientific™ BindIt™ Software for KingFisher™ instruments»⁷ для работы с прибором KingFisher™ осуществляется согласно руководству по эксплуатации программного обеспечения.

8.2.4 Внесение образцов и запуск протокола в работу

8.2.4.1 Внести в ячейки подготовленного планшета D1 с реагентами исследуемые⁸ и контрольные (ПК, ОК) образцы в объеме 100 мкл, используя для каждого образца отдельный наконечник.

8.2.4.2 Выбрать в программном обеспечении «Thermo Scientific™ BindIt™ Software for KingFisher™ instruments» загруженный протокол «NA100-KF».

8.2.4.3 По запросу программного обеспечения прибора установить в него подготовленные планшеты D1, D2, D3, Э, Гр. После установки планшетов запустить процедуру экстракции НК.

8.2.4.4 Надосадочная жидкость в планшете Э, полученная в результате автоматической экстракции, содержит очищенные НК, которые можно использовать для постановки ОТ и/или ПЦР.

8.3 Экстракция НК при использовании формы выпуска 2 (ручная методика с использованием магнитного штатива или центрифугирования)

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, исследуемых и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтром для каждого реагента/образца.

8.3.1 Подготовка реагентов

8.3.1.1 Перемешать тщательно взбалтыванием Буфер D1, Буфер D2, Буфер D3.

8.3.1.2 Подготовить контрольные образцы (например, внутренний контроль (ВК), положительный контроль (ПК), отрицательный контроль (ОК)), входящие в состав набора реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР и используемые со стадии экстракции, согласно инструкции по его применению.

8.3.1.3 Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с Реагентом МР на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную, без

⁷ Программное обеспечение поставляется с процессором магнитных частиц KingFisher™.

⁸ Для образцов цельной крови, мокроты и фекалий необходимо провести предобработку согласно разделу 10.

центрифугирования.

8.3.1.4 Внести всё содержимое пробирки с Реагентом МР и ВК, если он включён в состав набора реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР, в Буфер D1. Полученную смесь тщательно перемешать взбалтыванием. Смесь допускается хранить не более 10 дней при температуре от 2 °С до 8 °С.

Примечание - При исследовании небольшого количества образцов Реагент МР и ВК допускается вносить непосредственно в пробирки для проведения экстракции из расчёта на один образец: 10 мкл Реагента МР и 10 мкл ВК.

8.3.2 Проведение экстракции НК с использованием центрифугирования

8.3.2.1 Промаркировать необходимое количество одноразовых пробирок объёмом 1,5 мл для исследуемых и контрольных (например, ПК, ОК) образцов.

8.3.2.2 Внести в каждую промаркированную пробирку:

- по 500 мкл подготовленной смеси ВК, Реагента МР и Буфера D1, ИЛИ
- по 10 мкл ВК, 10 мкл Реагента МР, 500 мкл Буфера D1.

8.3.2.3 Внести в промаркированные пробирки исследуемые⁹ и контрольные образцы в объёме 100 мкл, используя для каждого образца отдельный наконечник. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

8.3.2.4 Поместить пробирки в термостат с температурой 80 °С на 5 мин.

8.3.2.5 Перемешать содержимое пробирок на вортексе.

8.3.2.6 Центрифугировать в течение 1 мин при 10000 x g.

8.3.2.7 По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждого образца.

8.3.2.8 Добавить в пробирки по 500 мкл Буфера D2. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

8.3.2.9 Поместить пробирки в термостат с температурой 80 °С на 3 мин.

8.3.2.10 Перемешать содержимое пробирок на вортексе.

8.3.2.11 Центрифугировать в течение 1 мин при 10000 x g.

8.3.2.12 Удалить надосадочную жидкость аналогично п. 11.3.2.7.

8.3.2.13 Добавить в пробирки по 900 мкл Буфера D3.

ВНИМАНИЕ! После добавления Буфера D3 содержимое пробирок **не перемешивать**.

8.3.2.14 Центрифугировать в течение 1 мин при 10000 x g.

8.3.2.15 Удалить надосадочную жидкость аналогично п. 11.3.2.7.

8.3.2.16 Добавить в пробирки от 100 до 200 мкл Буфера D3. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

Примечание – Требуемый объём Буфера D3 (объём элюции) см. в инструкции по применению набора реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР.

8.3.2.17 Поместить пробирки в термостат с температурой 80°С на 5 мин,

⁹ Для образцов цельной крови, мокроты и фекалий необходимо провести предобработку согласно разделу 10.

перемешивая каждые 2 мин.

8.3.2.18 Центрифугировать в течение 1 мин при 10000 x g.

8.3.2.19 Надосадочную жидкость, содержащую очищенные НК, можно использовать для постановки реакции ОТ и/или ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Внесение препарата ДНК/РНК в реакцию необходимо провести незамедлительно после центрифугирования. Если в течение 3 мин после центрифугирования препарат не был внесён в реакцию, необходимо провести повторное центрифугирование.

8.3.3 Проведение экстракции НК с использованием магнитного штатива

8.3.3.1 Промаркировать необходимое количество одноразовых пробирок объёмом 1,5 мл для исследуемых и контрольных (например, ПК, ОК) образцов.

8.3.3.2 Внести в каждую промаркированную пробирку:

- по 500 мкл подготовленной смеси ВК, Реагента МР и Буфера D1, ИЛИ
- по 10 мкл ВК, 10 мкл Реагента МР, 500 мкл Буфера D1.

8.3.3.3 Внести в промаркированные пробирки исследуемые¹⁰ и контрольные образцы в объёме 100 мкл, используя для каждого образца отдельный наконечник. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

8.3.3.4 Поместить пробирки в термостат с температурой 80°C на 5 мин.

8.3.3.5 Перемешать содержимое пробирок и осадить капли на вортексе.

8.3.3.6 Поместить пробирки в магнитный штатив на 2 мин.

8.3.3.7 Без снятия пробирок со штатива, по внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждого образца.

8.3.3.8 Добавить в пробирки по 500 мкл Буфера D2. Плотно закрыть крышки, перемешать и осадить капли на вортексе.

8.3.3.9 Поместить пробирки в термостат с температурой 80°C на 3 мин.

8.3.3.10 Перемешать содержимое пробирок и осадить капли на вортексе.

8.3.3.11 Поместить пробирки в магнитный штатив на 2 мин.

8.3.3.12 Удалить надосадочную жидкость аналогично п. 11.3.3.7.

8.3.3.13 Не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в них по 900 мкл Буфера D3 и оставить их в штативе на 3 мин.

ВНИМАНИЕ! После добавления Буфера D3 содержимое пробирок **не перемешивать**.

8.3.3.14 Удалить надосадочную жидкость аналогично п. 11.3.3.7.

8.3.3.15 Добавить в пробирки от 100 до 200 мкл Буфера D3. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

Примечание – Требуемый объём Буфера D3 (объём элюции) см. в инструкции по применению набора реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР.

8.3.3.16 Поместить пробирки в термостат с температурой 80°C на 5 мин,

¹⁰ Для образцов цельной крови, мокроты и фекалий необходимо провести предобработку согласно разделу 10.

перемешивая каждые 2 мин.

8.3.3.17 Осадить капли на вортексе и поместить пробирки в магнитный штатив на 2 мин.

8.3.3.18 Надосадочную жидкость, содержащую очищенные НК, можно использовать для постановки реакции ОТ и/или ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных НК для проведения дальнейшего исследования осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

8.4 Хранение очищенных НК

Для хранения НК необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Рекомендуется хранить очищенную ДНК:

- при температуре от 2 °С до 8 °С не более недели,
- при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С не более 6 месяцев,
- при температуре не выше минус 68 °С не более года.

Рекомендуется хранить очищенную РНК:

- при температуре от 2 до 8 °С не более 4 ч,
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С не более недели,
- при температуре не выше минус 68 °С не более года.

9 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

9.1 Контроли, используемые этапе экстракции НК

Контроль этапа экстракции НК осуществляется одновременно с оценкой достоверности результатов этапа амплификации согласно инструкции к используемому набору реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР. Результаты исследования контролей, проходящих экстракцию НК вместе с исследуемыми образцами, должны соответствовать критериям оценки, указанным в инструкции по применению набора реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР.

9.1.1 Отрицательный и положительный контроли

Каждая группа экстрагируемых образцов должна включать контрольные образцы, если они предусмотрены для проведения исследования согласно инструкции к используемому набору реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР:

- ОК для выявления контаминации в процессе проведения исследования;
- ПК для контроля корректного прохождения исследования.

9.1.2 Внутренний контроль

Для контроля качества экстракции НК и оценки влияния ингибиторов на результаты амплификации в исследовании может использоваться экзогенный¹¹ и эндогенный¹² внутренний контроль (ВК). Отсутствие результатов амплификации для ВК и одновременно для выявляемой мишени свидетельствует о возможном присутствии

¹¹ ВК, входящий в состав набора реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР.

¹² В качестве эндогенного ВК используются мишени, предусмотренные набором реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР.

ингибиторов ПЦР/ОТ-ПЦР в образце.

9.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Для выявления возможной контаминации лаборатории продуктами амплификации, исследуемыми и контрольными образцами рекомендуется раз в месяц исследовать смывы с рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений согласно процедуре, указанной в МУ 1.3.2569-09. При обнаружении контаминации необходимо провести мероприятия по её устранению согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления.

После вскрытия реагенты в пробирках и флаконах использовать до истечения срока годности набора. После вскрытия ячеек картриджа с реагентами экстракция с использованием вскрытых ячеек должна быть проведена в течение 140 мин (с учётом времени, затрачиваемого на внесение в ячейки исследуемых образцов и контролей).

10.2 Хранение

Набор хранить при температуре от 2 °С до 25 °С в защищённом от солнечного света месте. Не допускается замораживание реагентов.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

10.3 Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 °С до 25 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах. Не допускается замораживание реагентов.

10.4 Эксплуатация

Реагенты, входящие в состав набора, готовы к использованию.

Ячейки картриджа с реагентами предназначены для однократного использования.

Экстракция НК с использованием набора должна проводиться при температуре от 18 °С до 25 °С и относительной влажности воздуха от 25 % до 75 %.

11 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применены следующие сокращения:

ВК	–	внутренний контроль
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	–	дезоксирибонуклеаза
НК	–	нуклеиновые кислоты
ОК	–	отрицательный контроль
ОТ	–	обратная транскрипция
ПК	–	положительный контроль
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
РНКаза	–	рибонуклеаза

12 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении условий его транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора направлять в адрес производителя: ООО «Амплитек», 109235, Москва, ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42, тел. (495) 374-13-46, e-mail: support@amplitech.ru.

Сообщения о неблагоприятных событиях (инцидентах), возникших при работе с набором, следует направлять производителю по указанному выше адресу и в уполномоченный регуляторный орган согласно действующему законодательству.

13 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Консультацию по вопросам по работе с набором и его качеству можно получить по контактам, указанным на официальном сайте производителя: www.amplitech.ru.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Изготовитель



Использовать до



Дата изготовления



Не допускать воздействия
солнечного света



Код серии



Температурный диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению



Осторожно



Содержимого достаточно для
проведения <n> тестов



Верх



Номер по каталогу



Знаки опасности



Общество с ограниченной ответственностью «Амплитек»
(ООО «Амплитек»),
Россия, 109235, Москва,
ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42
тел. (495) 374-13-46, www.amplitech.ru,
e-mail: support@amplitech.ru