



IVD

Набор реагентов для экстракции ДНК/РНК из биологического материала
«МагноПрайм ЮНИ» по ТУ 21.20.23-024-09286667-2018

«МагноПрайм ЮНИ»

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ..... | 3 |
| 1. НАЗНАЧЕНИЕ | 4 |
| 1.1. Область применения..... | 4 |
| 1.2. Показания к применению: | 4 |
| 1.3. Противопоказания к применению:..... | 4 |
| 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА | 4 |
| 2.1. Состав и комплектность | 4 |
| 2.2. Принцип метода..... | 5 |
| 2.3. Функциональные характеристики..... | 6 |
| 3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА | 7 |
| 3.1. Отрицательный и положительный контроли экстракции НК..... | 7 |
| 3.2. Контроль ингибирования | 7 |
| 3.3. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации | 7 |
| 4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА | 8 |
| 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ | 8 |
| 6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ | 11 |
| 6.1. Взятие исследуемого материала | 11 |
| 6.2. Предварительная обработка исследуемого материала..... | 12 |
| 6.3. Автоматическая методика экстракции НК | 14 |
| 6.4. Ручная методика экстракции НК..... | 14 |
| 7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ | 15 |
| 7.1. Цельная кровь | 16 |
| 7.2. Мазки из полости носа | 17 |
| 7.3. Мазки со слизистой оболочки ротоглотки..... | 17 |
| 7.4. Спинномозговая жидкость (ликвор) | 17 |
| 7.5. Мазки со слизистой оболочки влагалища..... | 17 |
| 7.6. Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала | 18 |
| 7.7. Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры | 18 |
| 7.8. Моча | 19 |
| 7.9. Слюна..... | 20 |
| 7.10. Мокрота | 20 |
| 7.11. Фекалии..... | 20 |
| 8. ЭКСТРАКЦИЯ НК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА | 22 |
| 8.1. Автоматическая методика экстракции | 22 |
| 8.2. Ручная методика экстракции с использованием магнитного штатива | 24 |
| 8.3. Ручная методика экстракции с использованием центрифугирования | 27 |
| 8.4. Хранение очищенных НК..... | 29 |
| 9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА...29 | |
| 10. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ | 30 |
| 11. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ..... | 31 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

| | | |
|----------------------|---|--|
| ВКО | – | внутренний контрольный образец |
| ДНК | – | дезоксирибонуклеиновая кислота |
| ДНКаза | – | дезоксирибонуклеаза |
| Набор/МагноПрайм ЮНИ | – | Набор реагентов для экстракции ДНК/РНК из биологического материала «МагноПрайм ЮНИ» по ТУ 21.20.23-024-09286667-2018 |
| НК | – | нуклеиновые кислоты |
| ОК | – | отрицательный контроль |
| ОТ | – | обратная транскрипция |
| ПК | – | положительный контроль |
| ПЦР | – | полимеразная цепная реакция |
| РНК | – | рибонуклеиновая кислота |
| РНКаза | – | рибонуклеаза |

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначен для экстракции ДНК бактерий, грибов, простейших и ДНК/РНК вирусов из биологического материала, перечисленного ниже, для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР):

- цельная кровь, плазма крови и отдельные анализы крови (лейкоциты крови);
- мазки из респираторного тракта, мокрота, слюна;
- соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (данный вид биоматериала используется для экстракции ДНК);
- моча (данный вид биоматериала используется для экстракции ДНК);
- фекалии;
- спинномозговая жидкость (ликвор).

Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот, при условии, что запрограммирована последовательность действий, изложенная в данной инструкции.

1.1. Область применения

Набор используется в клинической лабораторной диагностике для экстракции ДНК бактерий, грибов, простейших и ДНК/РНК вирусов из биологического материала, полученного от лиц с подозрением на инфекционные заболевания.

1.2. Показания к применению

Набор используется в комплексном анализе выявления инфекционных заболеваний с последующим исследованием экстрагированных образцов НК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1.3. Противопоказания к применению

Нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требований инструкции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

Состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно. Набор рассчитан на выделение ДНК/РНК из 96 образцов, включая контроли.

Состав набора

| Реагент | Объем, мл | Количество | Описание |
|---|-----------|------------|---|
| Буфер L ¹  Опасно | 48,0 | 1 флакон | Лизирующий раствор. Прозрачная жидкость ² . |
| Буфер W1 ¹  Опасно | 68,0 | 1 флакон | Раствор для отмывки. Прозрачная жидкость ² . |
| Буфер W2 ¹  Опасно | 68,0 | 1 флакон | Раствор для отмывки. Прозрачная жидкость. |
| Буфер W3 ¹  Опасно | 68,0 | 1 флакон | Раствор для отмывки. Прозрачная жидкость. |
| Буфер E1 | 24,0 | 1 флакон | Раствор для элюции. Прозрачная жидкость. |
| МГС | 0,96 | 1 пробирка | Сорбент (магнетизированная силика). Суспензия. |
| Реагент А | 0,96 | 1 пробирка | Вспомогательный реагент для проведения лизиса. Прозрачная жидкость. |

Таблица 2

Комплектность набора

| Компонент | Формат | Количество |
|--|---|------------|
| Набор реагентов | – | 1 |
| Инструкция по применению набора | в электронном виде на официальном сайте Производителя по адресу: http://www.nextbio.ru/reagents/ | 1 |
| Краткое руководство по применению набора | в бумажном виде | 1 |
| Паспорт качества | в электронном виде на официальном сайте Производителя по адресу: http://www.nextbio.ru/passport/ | 1 |

2.2. Принцип метода

Исследуемый образец³ в объеме 100 мкл обрабатывается лизирующим раствором в присутствии частиц магнетизированной силики – магнитного сорбента. В результате происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК/РНК. Растворенная ДНК/РНК связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного биологического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента на магнитном штативе/стержне или с использованием центрифуги и с последующими отмывками сорбента. При добавлении буфера для

¹ Реагенты содержат опасные вещества. Информацию по опасным веществам и мерам предосторожности при работе с реагентами см. в разделе инструкции «Меры предосторожности и предупреждения».

² При хранении Буфера L и Буфера W1 возможно образование осадка в виде кристаллов.

³ Для некоторых видов биологического материала требуется помещение материала в транспортную среду и/или этап предварительной обработки. См. раздел инструкции «Исследуемый материал».

элюции ДНК/РНК к магнитному сорбенту происходит переход ДНК/РНК с поверхности силики в раствор, который затем отделяется от частиц сорбента магнитной силой либо центрифугированием.

2.3. Функциональные характеристики

Чистота выделения НК составляет не менее 1,6 и не менее 1,8, для ДНК и РНК соответственно, при соотношении поглощения при длинах волн 260 и 280 нм (260/280).

Влияние интерферирующих веществ на эффективность экстракции НК при использовании набора отсутствует. Это было показано при проведении следующих тестирований с использованием образцов биоматериала и добавлении к ним интерферирующих веществ в максимально возможной концентрации:

- оценка влияния гемоглобина в концентрации 160 мг/мл при экстракции ДНК *CMV* из цельной крови и РНК *HCV* из плазмы крови;
- оценка влияния лактоферрина в концентрации 1 мкг/мл при экстракции РНК *HCV* из плазмы крови;
- оценка влияния гематина в концентрации 15,2 мкг/мл при экстракции РНК *HCV* из плазмы крови;
- оценка влияния иммуноглобулина G в концентрации 16 мг/мл при экстракции РНК *HCV* из плазмы крови;
- оценка влияния гликохолата натрия в концентрации 111 нг/мл при экстракции РНК *HCV* из плазмы крови;
- оценка влияния натрия таурохолат гидрата в концентрации 38 нг/мл при экстракции РНК *HCV* из плазмы крови;
- оценка влияния гликогена в концентрации 120 мг/мл при экстракции РНК *HCV* из плазмы крови;
- оценка влияния муцина в концентрации 2,27 мг/мл при экстракции ДНК *T. vaginalis* из образцов отделяемого слизистой оболочки урогенитального тракта и экстракции ДНК *Streptococcus* spp. из образцов мокроты;
- оценка влияния мочевины в концентрации 0,33 мМ/мл при экстракции ДНК *E. coli* из образцов мочи;
- оценка влияния хлорофилла в концентрации 2,6 мкг/мл при экстракции ДНК *Candida* spp. из образцов фекалий;
- оценка влияния хлоргексидина в концентрации 0,5 % при экстракции ДНК *C. trachomatis* из образцов отделяемого слизистой оболочки урогенитального тракта;
- оценка влияния мирамистина в концентрации 0,001 % при экстракции ДНК *C. trachomatis* из образцов отделяемого слизистой оболочки урогенитального тракта;

- оценка влияния ацикловира в концентрации 23,7 мкг/мл при экстракции РНК *HCV* из плазмы крови.

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль этапа экстракции НК осуществляется одновременно с оценкой достоверности результатов этапа амплификации.

3.1. Отрицательный и положительный контроли экстракции НК

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать контрольные образцы, если они предусмотрены для проведения исследования согласно инструкции к используемому набору реагентов для проведения амплификации:

- отрицательный контроль (ОК) для подтверждения отсутствия ложноположительных результатов и контроля контаминации. В качестве ОК используют реагент, входящий в состав набора реагентов для проведения амплификации;

- положительный контроль (ПК), если он предусмотрен для проведения ПЦР-исследования. В качестве ПК используют реагент, входящий в состав набора реагентов для проведения амплификации.

Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в инструкции по применению набора реагентов для проведения амплификации.

3.2. Контроль ингибирования

Для оценки влияния ингибиторов на результаты амплификации в ПЦР-исследовании может использоваться экзогенный⁴ и эндогенный⁵ ВКО. Экзогенный ВКО необходимо добавить в каждый исследуемый и контрольный образец согласно инструкции по применению набора реагентов для проведения амплификации. ВКО проходит все стадии экстракции совместно с анализируемыми образцами. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в инструкции по применению набора для проведения амплификации.

3.3. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится

⁴ ВКО, входящий в состав набора реагентов для проведения амплификации.

⁵ В качестве эндогенного ВКО используются мишени, предусмотренные набором реагентов для проведения амплификации.

путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

4.1. Набор «МагноПрайм ЮНИ» применяется только для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор предназначен для экстракции ДНК/РНК биологических агентов только из биологического материала, указанного в разделе «Назначение». Применение набора для выделения НК из другого вида биологического материала не гарантирует эффективности действия методики, лежащей в основе работы набора, и может привести к получению недостоверного результата.

4.3. Необходимо соблюдать требования к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала, указанные в разделе «Исследуемый материал». Невыполнение данных требований может повлиять на эффективность экстракции НК.

4.4. Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических 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».

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к

получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁶, биологический материал⁷, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром⁸. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Набор предназначен для однократного применения для проведения экстракции ДНК/РНК из указанного количества образцов (см. раздел «Состав и комплектность»).

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08).

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

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

- Не смешивать реагенты из разных серий набора.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть

⁶ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

⁷ Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

⁸ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

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

- Входящие в состав набора Буфер E1, Реагент А и МГС содержат натрия азид в концентрации не более 0,1 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности, кроме указанных в данном разделе.

- Входящие в состав набора реагенты Буфер L, Буфер W1, Буфер W2, Буфер W3 содержат опасные вещества, указанные в таблице 3. Заявления об опасности и меры предосторожности, требуемые при работе с данными реагентами, описаны в таблице 3. Расшифровка кодов для заявлений об опасности и мер предосторожности представлена в таблице 4.

Таблица 3

Заявления об опасности и меры предосторожности при работе с Буфером L, Буфером W1, Буфером W2 и Буфером W3

| Реагент | Опасные вещества | Заявления об опасности | Меры предосторожности |
|----------|---|--|---|
| Буфер L | изопропанол, гуанидин хлорид, гуанидин тиоцианат, тритон X-100, 1-тиоглицерол | H225, H302, H311, H312, H315, H319, H332, H336, H411, H412, EUN032 | P210, P233, P241, P242, P261, P264, P270, P271, P273, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P312, P332+P313, P337+P313, P362+P364, P370+P378, P403+P235, P501 |
| Буфер W1 | изопропанол, гуанидин тиоцианат | H225, H302, H312, H319, H332, H336, H412, EUN032 | P210, P233, P241, P242, P261, P264, P271, P273, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P312, P337+P313, P370+P378, P403+P235, P501 |
| Буфер W2 | изопропанол | H225, H319, H336 | P210, P233, P241, P242, P261, P264, P271, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P312, P337+P313, P370+P378, P403+P235, P501 |
| Буфер W3 | изопропанол | H225, H319, H336 | P210, P233, P241, P242, P261, P264, P271, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P312, P337+P313, P370+P378, P403+P235, P501 |

Таблица 4

Расшифровка кодов для заявлений об опасности и мер предосторожности

| Заявления об опасности | |
|---|--|
| H225: Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. | H336: Может вызывать вялость или сонливость. |
| H302: Вредно при проглатывании. | H411: Токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями. |
| H311: Токсично при контакте с кожей. | H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями. |
| H312: Вредно при контакте с кожей. | EUN032: При контакте с кислотами освобождаются очень токсичные газы. |
| H315: Вызывает раздражение кожи. | |
| H319: Вызывает серьезное раздражение глаз. | |
| H332: Вредно при вдыхании. | |

| Меры предосторожности | |
|---|--|
| <p>P210: Хранить вдали от источников тепла, горячих поверхностей, искр, открытого пламени и других источников воспламенения. Не курить.</p> <p>P233: Хранить в плотно закрытой таре.</p> <p>P241: Использовать взрывобезопасное электрическое оборудование.</p> <p>P242: Используйте только не искрящие инструменты.</p> <p>P261: Избегать вдыхания паров.</p> <p>P264: Вымойте руки после работы тщательно.</p> <p>P270: Не есть, не пить и не курить в процессе использования этого продукта.</p> <p>P271: Используйте только на открытом воздухе или в хорошо вентилируемом помещении.</p> <p>P273: Избегать попадания в окружающую среду.</p> <p>P280: Пользоваться защитными перчатками и средствами защиты глаз.</p> <p>P303+P361+P353: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): Немедленно снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой или принять душ.</p> | <p>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.</p> <p>P312: Обратиться к врачу при плохом самочувствии.</p> <p>P332+P313: При раздражении кожи: обратиться к врачу.</p> <p>P337+P313: Если раздражение глаз не проходит, обратиться за медицинской консультацией.</p> <p>P362+P364: Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед повторным использованием.</p> <p>P370+P378: В случае пожара: Использовать огнетушитель для тушения.</p> <p>P403+P235: Хранить в прохладном, хорошо вентилируемом месте.</p> <p>P501: Утилизировать содержимое в соответствии с национальными правилами СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».</p> |

- Листы безопасности реагентов, входящих в состав набора, доступны по запросу.

- Использование набора по назначению и соблюдение вышеперечисленных мер предосторожности исключает негативное воздействие на организм человека. При аварийных ситуациях возможно причинение вреда при попадании на кожу и слизистую оболочку глаз, при вдыхании и при проглатывании.

5.3. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Транспортная среда для хранения и транспортировки биологического материала (соскобного материала и отделяемого слизистых оболочек урогенитального и респираторного тракта), содержащая изотонический водно-солевой раствор с консервантом. Хранить и транспортировать в течение 7 - 28 дней согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде.

6.1.2. Зонд для взятия биологического материала с поверхности слизистых оболочек урогенитального тракта стерильный одноразовый из полипропилена/полистирола или одноразовый стерильный зонд-тампон из полипропилена/полистирола с вискозой или хлопком. (цервикального канала,

влагалища, уретры), полости носа, ротоглотки.

6.1.3. Емкость для взятия, транспортировки и хранения мочи, фекалий (объемом до 150 мл), мокроты, слюны, ликвора (объемом до 2 мл), однократного применения, стерильная, с завинчивающейся или плотно защелкивающейся крышкой, изготовленная из полипропилена.

6.1.4. Вакуумные пробирки для взятия крови с антикоагулянтом (раствором ЭДТА или цитратом натрия).

6.1.5. Двухсторонняя игла для взятия крови в вакуумную пробирку, одноразовая, стерильная.

6.1.6. Игла для забора ликвора, одноразовая, стерильная.

6.1.7. Одноразовые наконечники из полипропилена для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл (для водянистых фекалий) или одноразовая лопатка из полипропилена/полистирола (для твердых фекалий).

6.2. Предварительная обработка исследуемого материала

6.2.1. Предварительная обработка крови для получения лейкоцитарной массы или плазмы

6.2.1.1. Микроцентрифужные одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 или 2 мл.

6.2.1.2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

6.2.1.3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 1 600 g.

6.2.1.4. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл.

6.2.2. Предварительная обработка мочи

6.2.2.1. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала, содержащая консервант, или физиологический раствор (0,9 % раствор натрия хлорида) стерильный, или вакуумные пробирки для забора мочи.

6.2.2.2. Микроцентрифужные одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.

6.2.2.3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

6.2.2.4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 200 мкл.

6.2.2.5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 10 000 g.

6.2.2.6. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.

6.2.2.7. Вортекс.

6.2.2.8. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл.

6.2.3. Предварительная обработка мокроты

6.2.3.1. Реагент для предобработки мокроты с целью проведения экстракции НК.

6.2.4. Предварительная обработка фекалий

6.2.4.1. Приготовление фекальной суспензии

6.2.4.1.1. Фосфатный буферный раствор или физиологический раствор (0,9 % раствор натрия хлорида) стерильный.

6.2.4.1.2. Глицерин (при необходимости длительного хранения).

6.2.4.1.3. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.

6.2.4.1.4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (для водянистых фекалий) или одноразовая лопатка (для твердых фекалий).

6.2.4.1.5. Вортекс.

6.2.4.1.6. Автоматический дозатор переменного объема на 200 мкл.

6.2.4.2. Подготовка фекалий методом центрифугирования

6.2.4.2.1. Фосфатный буферный раствор.

6.2.4.2.2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.

6.2.4.2.3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл.

6.2.4.2.4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 12 000 g.

6.2.4.2.5. Вортекс.

6.2.4.2.6. Автоматический дозатор переменного объема на 200 мкл.

6.2.4.3. Подготовка фекалий методом экспресс-фльтрации

6.2.4.3.1. Фосфатный буферный раствор.

6.2.4.3.2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.

6.2.4.3.3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

6.2.4.3.4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 1000 мкл.

6.2.4.3.5. Одноразовый ватный зонд.

6.2.4.3.6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 10 000 g.

6.2.4.3.7. Вортекс.

6.2.4.3.8. Автоматический дозатор переменного объема на 200 мкл.

6.3. Автоматическая методика экстракции НК

ВНИМАНИЕ! При работе с набором следует использовать только одноразовые полипропиленовые пробирки и наконечники, сертифицированные на отсутствие ДНКаз и РНКаз.

6.3.1. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А.

6.3.2. Вортекс.

6.3.3. Автоматическая станция для экстракции НК Xiril (Neon-100), либо аналогичная, рекомендованная производителем, зарегистрированная в РФ и удовлетворяющая следующим требованиям:

- возможность реализации последовательности этапов экстракции, описанной в разделе «Экстракция НК из исследуемого материала» (п. 8.1.2);

- наличие системы дозирования жидкостей в диапазоне не менее от 50 до 700 мкл;

- наличие магнитного штатива или магнитных стержней для сбора магнетизированной силики;

- наличие термостата или термошейкера с возможностью нагрева не менее чем до 80 °С;

- наличие системы перемешивания жидкостей шейкированием или пипетированием.

6.3.4. Комплект расходных материалов для автоматической станции для экстракции НК согласно инструкции Производителя.

6.3.5. Холодильник от 2 до 8 °С.

6.3.6. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.3.7. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

6.4. Ручная методика экстракции НК

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл, свободные от ДНКаз и РНКаз.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз и РНКаз, для дозаторов

переменного объема с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.

6.4.3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 200 мкл.

6.4.4. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.

6.4.5. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл - при проведении экстракции с использованием магнитного штатива (см. раздел «Экстракция НК из исследуемого материала», п. 8.2).

6.4.6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 10 000 g - при проведении экстракции с использованием центрифугирования (см. раздел «Экстракция НК из исследуемого материала», п. 8.3).

6.4.7. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А.

6.4.8. Вортекс.

6.4.9. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» с возможностью нагрева не менее чем до 80 °С.

6.4.10. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.

6.4.11. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.12. Холодильник от 2 до 8 °С.

6.4.13. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.14. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат:

- цельная кровь, плазма крови, отдельные анализы крови (лейкоциты крови);
- мазки из респираторного тракта (мазки из полости носа, мазки со слизистой оболочки ротоглотки), мокрота, слюна;
- соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта⁹ (мазки со слизистой оболочки влагалища, соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала и соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры);
- моча⁹ (осадок первой порции утренней мочи);
- фекалии;
- спинномозговая жидкость (ликвор).

Наиболее информативными являются исследования материала, полученного

⁹ Данный вид биоматериала используется для экстракции ДНК.

непосредственно из потенциального очага инфекционного процесса. Поскольку инфекционный процесс может захватывать несколько очагов, для получения наиболее исчерпывающей информации пробы материала необходимо брать из всех очагов, где имеются признаки воспаления или находятся клетки-мишени для инфекционных агентов. Решение о выборе места взятия исследуемого материала принимает лечащий врач в зависимости от диагностической задачи.

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

7.1. Цельная кровь

7.1.1. Взятие материала

Взятие крови проводится натошак или через 3 часа после приема пищи в пробирку с антикоагулянтом (раствором ЭДТА или цитрата натрия).

ВНИМАНИЕ! Недопустимо использовать гепарин в качестве антикоагулянта.

Для тщательного перемешивания крови с антикоагулянтом необходимо несколько раз перевернуть пробирку.

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.

7.1.2. Предварительная обработка для получения лейкоцитарной массы

Пробирки с цельной кровью центрифугировать при 800 - 1600 g в течение 20 мин. После удаления плазмы, используя наконечник с фильтром, аккуратно собрать клетки крови (лейкоцитарную массу) с поверхности осадка в объеме 200 мкл и перенести в стерильную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл.

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

7.1.3. Предварительная обработка для получения плазмы

Пробирки с цельной кровью центрифугировать 20 мин при 800 - 1600 g. Затем отобрать плазму в количестве не менее 1 мл с использованием отдельного для каждого образца наконечника с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

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.

7.2. Мазки из полости носа

Взятие материала провести из полости носа с помощью стерильного зонда-тампона в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

7.3. Мазки со слизистой оболочки ротоглотки

Взятие материала провести с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки с помощью одноразового стерильного зонда-тампона из полипропилена/полистирола с вязкой или хлопком в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, содержащую изотонический водно-солевой раствор с консервантом, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.4. Спинномозговая жидкость (ликвор)

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

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 только однократное замораживание-оттаивание материала.

7.5. Мазки со слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести из заднебокового свода влагалища с помощью стерильного одноразового зонда-тампона или универсального зонда из полипропилена/полистирола для забора клинического материала в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда. Головка

(рабочая часть) зонда может отламываться по имеющейся насечке от ручки зонда. Необходимо максимально полно собрать отделяемое. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, содержащую изотонический водно-солевой раствор с консервантом, хранить и транспортировать в течение 7 - 28 дней согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.6. Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала

Перед получением материала слизь и отделяемое влагалища с поверхности шейки матки удалить стерильным марлевым тампоном.

Взятие материала провести из цервикального канала с помощью стерильной одноразовой цервикальной цитощетки или универсального зонда из полипропилена/полистирола для забора клинического материала в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению цитощетки/зонда. При использовании универсального зонда объем соскобного отделяемого будет меньше. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде цервикальной слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, содержащую изотонический водно-солевой раствор с консервантом, хранить и транспортировать в течение 7 - 28 дней согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.7. Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры

Перед взятием соскоба из уретры необходимо обработать наружное отверстие уретры тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором, чтобы удалить отделяемое из влагалища.

Взятие отделяемого уретры проводить с помощью стерильного одноразового универсального зонда из полипропилена/полистирола для забора клинического материала в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, содержащую изотонический водно-солевой раствор с консервантом, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.8. Моча

7.8.1. Порядок сбора

Женщины для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальную емкость из полипропилена для сбора биологического материала объемом до 150 мл, с завинчивающейся или плотно защелкивающейся крышкой. Сбор мочи провести после тщательного туалета наружных половых органов. Желательно закладывать тампон во влагалище перед сбором материала для предупреждения контаминации мочи отделяемым из влагалища. Также не следует производить сбор мочи во время менструации.

У мужчин при мочеиспускании необходимо освободить наружное отверстие мочеиспускательного канала, полностью оттянув кожную складку. Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальную емкость из полипропилена для сбора биологического материала объемом до 150 мл, с завинчивающейся или плотно защелкивающейся крышкой.

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

- 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 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 лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.8.2. Предварительная обработка

Флакон с мочой взболтать. Перенести 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугировать 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.

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

7.9. Слюна

Отобрать не менее 1 мл слюны в одноразовую стерильную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл.

Допускается хранение образцов 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 не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.10. Мокрота

7.10.1. Взятие материала

Отобрать мокроту в количестве не менее 1,0 мл в одноразовый стерильный контейнер с широким горлом и завинчивающимися крышками объемом не менее 50 мл.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 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 не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.10.2. Предварительная обработка

Необходимо провести разжижение мокроты, используя реагент для предобработки мокроты с целью проведения экстракции нуклеиновых кислот, в соответствии с инструкцией по использованию данного реагента.

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

7.11. Фекалии

7.11.1. Взятие материала

Использовать пробы фекалий массой (объемом) примерно 1 - 3 г (1 - 3 мл). Перенести пробу в количестве 1 г (1 мл) отдельным полипропиленовым наконечником с фильтром или одноразовой лопаткой из полипропилена/полистирола в одноразовый стерильный полипропиленовый контейнер объемом 150 мл.

Условия хранения и перевозки образцов нативных фекалий:

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

7.11.2. Предварительная обработка

При исследовании нативных фекалий без предшествующего замораживания готовят фекальную суспензию. При водянистой консистенции фекалий приготовление суспензии не требуется.

7.11.2.1. Приготовление фекальной суспензии

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 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 15-20 %. После тщательной гомогенизации с использованием вортекса и экспозиции с глицерином в течение 30–40 мин пробы заморозить.

Условия хранения предварительно обработанных проб:

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

7.11.2.2. Подготовка фекалий методом центрифугирования

Для подготовки фекалий методом центрифугирования используют фекалии водянистой консистенции, свежеприготовленную суспензию фекалий или суспензию, подвергавшуюся замораживанию с глицерином.

Пробирки с суспензией или водянистыми фекалиями центрифугировать 5 мин при 7 000–12 000 g. Используя наконечник с фильтром, из пробирки отобрать бактериальную фракцию в объеме 50 мкл (верхняя бело-желтая часть образовавшегося осадка). При отсутствии бело-желтого пограничного слоя между осадком и супернатантом отобрать 100 мкл с границы осадка или супернатанта. При отсутствии осадка отобрать 100 мкл со дна пробирки.

Отобранную часть пробы перенести в новую пробирку и использовать для проведения экстракции ДНК/РНК. Допускается разведение супернатанта фосфатно-солевым буфером в соотношении 1:1 в случае получения невалидных результатов ПЦР-исследования из-за ингибирования реакции амплификации.

Условия хранения предварительно обработанных проб:

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

- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

7.11.2.3. Подготовка фекалий методом экспресс-фильтрации

Для проведения фильтрации используют фекалии водянистой консистенции, свежеприготовленную суспензию фекалий или суспензию, подвергавшуюся замораживанию с глицерином.

Для экспресс-фильтрации необходимо использовать два наконечника объемом 1000 мкл (один с аэрозольным фильтром, другой – без него). В наконечник без аэрозольного фильтра вставить отрезанную рабочую часть одноразового ватного зонда (ватной палочки) и зафиксировать проталкиванием в суженную часть наконечника.

Наконечником с аэрозольным фильтром забрать 1 мл фекальной суспензии, вставить его в подготовленный наконечник с ватным фильтром и пропустить суспензию через фильтр в новую одноразовую пробирку. При затрудненной фильтрации рекомендуется уменьшить концентрацию фекальной суспензии. Допускается разведение супернатанта фосфатно-солевым буфером в соотношении 1:1 в случае получения невалидных результатов ПЦР-исследования из-за ингибирования реакции амплификации.

Условия хранения предварительно обработанных проб:

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

8. ЭКСТРАКЦИЯ НК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Экстракция НК должна проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории¹⁰:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность от 40 до 75 %.

8.1. Автоматическая методика экстракции

ВНИМАНИЕ! При использовании автоматической станции для экстракции НК необходимо ознакомиться с инструкцией по эксплуатации данной автоматической станции и запрограммировать последовательность действий, указанную в п. 8.1.2.

ВНИМАНИЕ! Если в состав набора для проведения амплификации включены ВКО, отрицательный (ОК) и положительный (ПК) контроли¹¹, то их необходимо использовать на стадии экстракции согласно инструкции по применению данного

¹⁰ Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

¹¹ Результаты постановки контролей используются при оценке достоверности результатов ПЦР-исследования биологических образцов. Анализ и оценка результатов для контролей проводится согласно инструкции к набору реагентов для проведения амплификации.

набора.

8.1.1. Подготовка к проведению процедуры экстракции НК

8.1.1.1. Перемешать взбалтыванием Буфер L, Буфер W1, Буфер W2, Буфер W3 и Буфер E1.

8.1.1.2. Перемешать Реагент А, ВКО, ПК, ОК и осадить капли на вортексе.

8.1.1.3. Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с МГС на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную (без центрифугирования).

8.1.1.4. Приготовить в отдельной пробирке объемом 1,5 мл смесь Реагента А, МГС и ВКО, добавив компоненты в объемах из расчета на один образец: **10 мкл Реагента А, 10 мкл МГС и 10 мкл ВКО¹²**, также учитывая запас – на один образец больше. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

Примечание - Допускается внесение всего содержимого пробирок с **Реагентом А, МГС** и объема **ВКО¹²**, необходимого для проведения исследования 96 образцов, в **Буфер L**. Полученную смесь тщательно перемешать взбалтыванием. Смесь хранить не более 2 месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

ВНИМАНИЕ! Необходимо скорректировать объем ВКО для расчета объема смеси реагентов, если при проведении экстракции одновременно используются несколько различных препаратов ВКО, либо добавляемый объем ВКО отличается от 10 мкл.

8.1.2. Процедура экстракции НК

8.1.2.1. Внести в каждую пробирку объемом 1,5 мл или ячейку картриджа (в зависимости от модели автоматической станции) для исследуемых и контрольных (если они предусмотрены для проведения исследования) образцов:

а) по **30 мкл** подготовленной смеси **ВКО, Реагента А, МГС** и по **500 мкл Буфера L**

или

б) по **530 мкл** подготовленной смеси **Реагента А, МГС, ВКО** и **Буфера L**.

ВНИМАНИЕ! Необходимо скорректировать объем приготовленной смеси, используемый для одного образца, если при проведении экстракции ВКО не используется, либо одновременно используется несколько различных препаратов ВКО, либо добавляемый объем ВКО отличается от 10 мкл.

8.1.2.2. Внести в пробирки исследуемые¹³ и контрольные образцы в объеме **100 мкл¹⁴**, используя для каждого образца отдельный наконечник. Перемешать

¹² Требуемый объем ВКО для одного образца смотрите в инструкции к используемому набору реагентов для проведения амплификации.

¹³ Для образцов крови, мочи, мокроты и фекалий необходимо произвести предобработку согласно разделу «Исследуемый материал».

¹⁴ Если объем образца, используемый для экстракции, менее 100 мкл согласно инструкции к используемому набору реагентов для проведения амплификации, необходимо довести его до 100 мкл способом, указанным в инструкции к набору для проведения амплификации.

содержимое пробирок.

8.1.2.3. Прогреть пробирки при температуре **60 °С** в течение **10 мин.**

8.1.2.4. Перемешать содержимое пробирок.

8.1.2.5. Поместить пробирки в магнитный штатив или опустить в пробирки магнитный стержень на **2 мин.**

8.1.2.6. Удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива или не вытаскивая магнитный стержень из пробирок.

8.1.2.7. Добавить в пробирки по **700 мкл Буфера W1**, перемешать содержимое пробирок.

8.1.2.8. Поместить пробирки в магнитный штатив или опустить в пробирки магнитный стержень на **2 мин.**

8.1.2.9. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 8.1.2.6.

8.1.2.10. Добавить в пробирки по **700 мкл Буфера W2**, перемешать содержимое пробирок.

8.1.2.11. Поместить пробирки в магнитный штатив или опустить в пробирки магнитный стержень на **2 мин.**

8.1.2.12. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 8.1.2.6.

8.1.2.13. Добавить в пробирки по **700 мкл Буфера W3** и удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива или не вытаскивая магнитный стержень из пробирок.

ВНИМАНИЕ! После добавления Буфера W3 содержимое пробирок не перемешивать.

8.1.2.14. Добавить в пробирки от **50 до 250 мкл Буфера E1** (см. инструкцию к используемому набору реагентов для проведения амплификации), перемешать.

8.1.2.15. Прогреть пробирки при температуре **80 °С** в течение **5 мин** с включенным перемешиванием.

8.1.2.16. Поместить пробирки в магнитный штатив или опустить в пробирки магнитный стержень на **2 мин.**

8.1.2.17. Вынуть магнитный стержень с силикой из пробирок или при использовании магнитного штатива перенести надосадочную жидкость в новую пробирку или плашку.

8.1.2.18. Элюат содержит очищенные ДНК и РНК. Пробы готовы к постановке реакции ОТ и/или ПЦР.

8.2. Ручная методика экстракции с использованием магнитного штатива

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, исследуемых и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! Если в состав набора для проведения амплификации включены ВКО, отрицательный (ОК) и положительный (ПК) контроли¹⁵, то их необходимо использовать на стадии экстракции согласно инструкции по применению данного набора.

8.2.1. Подготовка к проведению процедуры экстракции НК

8.2.1.1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный (ОК) и положительный (ПК) контроли. Промаркировать.

8.2.1.2. Перемешать взбалтыванием Буфер L, Буфер W1, Буфер W2, Буфер W3 и Буфер E1.

8.2.1.3. Перемешать Реагент А, ВКО, ПК, ОК и осадить капли на вортексе.

8.2.1.4. Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с МГС на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную (без центрифугирования), затем открыть пробирку и дополнительно перемешать пипетированием с помощью дозатора.

8.2.1.5. Приготовить в отдельной пробирке объемом 1,5 мл смесь Реагента А, МГС и ВКО, добавив компоненты в объемах из расчета на один образец: **10 мкл Реагента А, 10 мкл МГС и 10 мкл ВКО**¹⁶, также учитывая запас – на один образец больше. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

Примечание - Допускается внесение всего содержимого пробирок с **Реагентом А, МГС** и объема **ВКО**¹⁶, необходимого для проведения исследования 96 образцов, в **Буфер L**. Полученную смесь тщательно перемешать взбалтыванием. Смесь хранить не более 2 месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

ВНИМАНИЕ! Необходимо скорректировать объем ВКО для расчета объема смеси реагентов, если при проведении экстракции одновременно используются несколько различных препаратов ВКО, либо добавляемый объем ВКО отличается от 10 мкл.

8.2.2. Процедура экстракции НК

8.2.2.1. Внести в каждую пробирку объемом 1,5 мл для исследуемых и контрольных образцов:

а) по **30 мкл** подготовленной смеси **ВКО, Реагента А, МГС** и по **500 мкл Буфера L**

или

б) по **530 мкл** подготовленной смеси **Реагента А, МГС, ВКО** и **Буфера L**.

¹⁵ Результаты постановки контролей используются при оценке достоверности результатов ПЦР-исследования биологических образцов. Анализ и оценка результатов для контролей проводится согласно инструкции к набору реагентов для проведения амплификации.

¹⁶ Требуемый объем ВКО для одного образца смотрите в инструкции к используемому набору реагентов для проведения амплификации.

ВНИМАНИЕ! Необходимо скорректировать объем приготовленной смеси, используемый для одного образца, если при проведении экстракции ВКО не используется, либо одновременно используется несколько различных препаратов ВКО, либо добавляемый объем ВКО отличается от 10 мкл.

8.2.2.2. Внести в пробирки исследуемые¹⁷ и контрольные образцы в объеме **100 мкл**¹⁸, используя для каждого образца отдельный наконечник. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

8.2.2.3. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин.**

8.2.2.4. Перемешать содержимое пробирок и осадить капли на вортексе.

8.2.2.5. Перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин.**

8.2.2.6. Без снятия пробирок с магнитного штатива, по внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.

8.2.2.7. Добавить в пробирки по **700 мкл Буфера W1**. Плотно закрыть крышки.

8.2.2.8. Перемешать содержимое пробирок и осадить капли на вортексе.

8.2.2.9. Поместить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив на **2 мин.**

8.2.2.10. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 8.2.2.6.

8.2.2.11. Добавить в пробирки по **700 мкл Буфера W2**. Плотно закрыть крышки.

8.2.2.12. Перемешать содержимое пробирок и осадить капли на вортексе.

8.2.2.13. Поместить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив на **2 мин.**

8.2.2.14. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 8.2.2.6.

8.2.2.15. Не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в них по **700 мкл Буфера W3**.

ВНИМАНИЕ! После добавления Буфера W3 содержимое пробирок не перемешивать.

8.2.2.16. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 8.2.2.6.

8.2.2.17. Добавить в пробирки от **50 до 250 мкл Буфера E1** (см. инструкцию к используемому набору реагентов для проведения амплификации). Плотно закрыть крышки.

8.2.2.18. Перемешать содержимое пробирок на вортексе.

8.2.2.19. Поместить пробирки в термостат с температурой **80 °С** на **5 мин**, перемешивая каждые **2 мин.**

¹⁷ Для образцов крови, мочи, мокроты и фекалий необходимо произвести предобработку согласно разделу «Исследуемый материал».

¹⁸ Если объем образца, используемый для экстракции, менее 100 мкл согласно инструкции к используемому набору реагентов для проведения амплификации, необходимо довести его до 100 мкл способом, указанным в инструкции к набору для проведения амплификации.

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

8.2.2.21. Надосадочная жидкость содержит очищенные ДНК и РНК. Пробы готовы к постановке реакции ОТ и/или ПЦР.

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

8.3. Ручная методика экстракции с использованием центрифугирования

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, исследуемых и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! Если в состав набора для проведения амплификации включены ВКО, отрицательный (ОК) и положительный (ПК) контроли¹⁹, то их необходимо использовать на стадии экстракции согласно инструкции по применению данного набора.

8.3.1. Подготовка к проведению процедуры экстракции НК

8.3.1.1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный (ОК) и положительный (ПК) контроли. Промаркировать.

8.3.1.2. Перемешать взбалтыванием Буфер L, Буфер W1, Буфер W2, Буфер W3 и Буфер E1.

8.3.1.3. Перемешать Реагент А, ВКО, ПК, ОК и осадить капли на вортексе.

8.3.1.4. Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с МГС на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную (без центрифугирования), затем открыть пробирку и дополнительно перемешать пипетированием с помощью дозатора.

8.3.1.5. Приготовить в отдельной пробирке объемом 1,5 мл смесь Реагента А, МГС и ВКО, добавив компоненты в объемах из расчета на один образец: **10 мкл Реагента А, 10 мкл МГС и 10 мкл ВКО²⁰**, также учитывая запас – на один образец больше. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

Примечание - Допускается внесение всего содержимого пробирок с **Реагентом А, МГС** и объема **ВКО²⁰**, необходимого для проведения исследования 96 образцов, в **Буфер L**. Полученную смесь тщательно перемешать взбалтыванием. Смесь хранить не более 2 месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

ВНИМАНИЕ! Необходимо скорректировать объем ВКО для расчета объема смеси

¹⁹ Результаты постановки контролей используются при оценке достоверности результатов ПЦР-исследования биологических образцов. Анализ и оценка результатов для контролей проводится согласно инструкции к набору реагентов для проведения амплификации.

²⁰ Требуемый объем ВКО для одного образца смотрите в инструкции к используемому набору реагентов для проведения амплификации.

реагентов, если при проведении экстракции одновременно используются несколько различных препаратов ВКО, либо добавляемый объем ВКО отличается от 10 мкл.

8.3.2. Процедура экстракции НК

8.3.2.1. Внести в каждую пробирку объемом 1,5 мл для исследуемых и контрольных образцов:

а) по **30 мкл** подготовленной **смеси ВКО, Реагента А, МГС** и по **500 мкл Буфера L**

или

б) по **530 мкл** подготовленной **смеси Реагента А, МГС, ВКО и Буфера L.**

ВНИМАНИЕ! Необходимо скорректировать объем приготовленной смеси, используемый для одного образца, если при проведении экстракции ВКО не используется, либо одновременно используется несколько различных препаратов ВКО, либо добавляемый объем ВКО отличается от 10 мкл.

8.3.2.2. Внести в пробирки исследуемые²¹ и контрольные образцы в объеме **100 мкл**²², используя для каждого образца отдельный наконечник. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

8.3.2.3. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин.**

8.3.2.4. Перемешать содержимое пробирок на вортексе.

8.3.2.5. Центрифугировать в течение **1 мин** при **10 000 g.**

8.3.2.6. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.

8.3.2.7. Добавить в пробирки по **700 мкл Буфера W1.** Перемешать содержимое пробирок на вортексе.

8.3.2.8. Центрифугировать в течение **1 мин** при **10 000 g.**

8.3.2.9. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 8.3.2.6.

8.3.2.10. Добавить в пробирки по **700 мкл Буфера W2.** Перемешать содержимое пробирок на вортексе.

8.3.2.11. Центрифугировать в течение **1 мин** при **10 000 g.**

8.3.2.12. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 8.3.2.6.

8.3.2.13. Добавить в пробирки по **700 мкл Буфера W3.**

ВНИМАНИЕ! После добавления Буфера W3 содержимое пробирок не перемешивать.

²¹ Для образцов крови, мочи, мокроты и фекалий необходимо произвести предобработку согласно разделу «Исследуемый материал».

²² Если объем образца, используемый для экстракции, менее 100 мкл согласно инструкции к используемому набору реагентов для проведения амплификации, необходимо довести его до 100 мкл способом, указанным в инструкции к набору для проведения амплификации.

8.3.2.14. Центрифугировать в течение **1 мин** при **10 000 g**.

8.3.2.15. Отобратить надосадочную жидкость аналогично п. 8.3.2.6.

8.3.2.16. Добавить в пробирки от **50** до **250 мкл Буфера Е1** (см. инструкцию к используемому набору реагентов для проведения амплификации), перемешать на вортексе.

8.3.2.17. Поместить пробирки в термостат с температурой **80 °С** на **5 мин**, перемешивая каждые **2 мин**.

8.3.2.18. Центрифугировать в течение **1 мин** при **10 000 g**.

8.3.2.19. Надосадочная жидкость содержит очищенные ДНК и РНК. Пробы готовы к постановке реакции ОТ и/или ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Внесение ДНК/РНК в реакцию необходимо провести незамедлительно после центрифугирования. Если в течение 3 мин после центрифугирования проба не внесена в реакцию, необходимо провести повторное центрифугирование.

8.4. Хранение очищенных НК

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 месяцев и при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

Очищенная РНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С 4 часа, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение недели и при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

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

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

9.2. Транспортирование

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

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

9.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 25 °С в течение всего срока годности набора. Не допускается замораживание реагентов.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Смесь, приготовленную из Буфера L, Реагента А, ВКО и МГС, хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 2 месяцев.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

10. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора реагентов «МагноПрайм ЮНИ» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394 г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

При выявлении нежелательных реакций при использовании набора, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в Российской Федерации – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

11. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

| | | | |
|--|---|---|------------------------|
|  | Номер по каталогу |  | Изготовитель |
|  | Код партии |  | Дата изготовления |
|  | Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i> |  | Использовать до |
|  | Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов |  | Температурный диапазон |
|  | Обратитесь к инструкции по применению |  | Символы опасности |
|  | Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению | | |