

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО «АртБиоТех»

А.Н.Рымко

25 октября 2023 г.



**Методические рекомендации по пробоподготовке материала
перед выделением нуклеиновых кислот с последующим анализом
методом ПЦР**

Методические рекомендации по пробоподготовке материала перед выделением нуклеиновых кислот с последующим анализом методом ПЦР

Содержание:

1. Кровь (плазма), сыворотка крови	2
2. Соскобное отделяемое слизистых оболочек прямой кишки	3
3. Соскобное отделяемое (мазок) из влагалища.....	3
4. Соскобное отделяемое (мазок) из цервикального канала	4
5. Моча	5
6. Соскобное отделяемое (мазок) из уретры	5
7. Сперма	6
8. Соскобное отделяемое (мазок) из полости носа	6
9. Соскобное отделяемое (мазок) из ротоглотки	7
10. Мокрота	7
11. Слюна	7
12. Бронхоальвеолярный лаваж или промывные воды бронхов	8
13. Пунктат Бубона.....	8
14. Материал из визикул и пустул.....	8
15. Амниотическая жидкость	9
16. Синовиальная жидкость	9
17. Фекалии	9
18. Спинномозговая жидкость (ликвор).....	11
19. Слезная жидкость	11
20. Отделяемое конъюнктивы.....	11
21. Биопсийный и аутопсийный материал	12
22. Клещи и эктопаразиты (вши, блохи).....	13
23. Вода, стоки, смывы	13

1. Кровь (плазма), сыворотка крови

Пробы крови (плазмы) используют при проведении качественных и количественных исследований, пробы сыворотки крови используют только при проведении качественных исследований с помощью методов амплификации нуклеиновых кислот.

Взятие материала

Для получения плазмы забор крови производят натошак или через 3 часа после приема пищи из вены одноразовой иглой в специальную вакуумную систему (сиреневые крышки – 6% ЭДТА) или одноразовым шприцем в пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8%-ый раствор цитрата натрия в соотношении 1:9). Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом.

Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя!

Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800-1600 g в течение 20 мин. при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром (пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

Клетки крови (лейкоцитарную фракцию цельной крови, лейкоцитарную пленку)

для выявления лейкотропных вирусов и т.д. следует отбирать после центрифугирования цельной крови и удаления плазмы. Используя наконечник с фильтром аккуратно собрать лейкоцитарную массу с поверхности осадка клеток в объеме 0,2 мл и перенести в стерильную пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

Для получения сыворотки забор крови проводят натошак одноразовой иглой в одноразовые пробирки без антикоагулянта. Далее, для получения сыворотки, пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин. до полного образования сгустка или помещают в термостат при 37°C на 15 мин. Затем центрифугируют при 800-1600 g в течение 10 мин. при комнатной температуре. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром (пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Сыворотка не должна быть гемолизированной.

Условия хранения и перевозки материала и предварительно обработанных проб

Образцы цельной крови:

- при температуре от +2 до +8°C в течение 6 ч с момента взятия материала для количественного определения нуклеиновых кислот;
- при температуре от +2 до +8°C в течение 12 ч - для качественного определения нуклеиновых кислот;
- при температуре от +2 до +8°C - в течение 1 сут. для качественного и количественного определения ДНК (РНК) инфекционных агентов.
- при температуре +20 – +25°C — в течение 2 часов;

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

Образцы плазмы и сыворотки:

- при температуре +2 до +8°C — в течение 5 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение года;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается только однократное замораживание/оттаивание материала, поэтому образцы плазмы или сыворотки для длительного хранения желательнее разлить небольшими (0,1 – 0,2 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл или 2,0 мл.

2. Соскобное отделяемое слизистых оболочек прямой кишки

Взятие материала.

Забор материала осуществляют с помощью специальных стерильных одноразовых инструментов - урогенитальных зондов, цитощеток или тампонов в зависимости от источника клинического материала согласно установленной процедуре.

После взятия клинического материала погрузить рабочую часть зонда в транспортную среду, рекомендованную производителем тест-систем. Оставить рабочую часть зонда в пробирке с транспортной средой, отломив ее в области насечки (если инструкция к набору реагентов предусматривает это). В случае отсутствия насечки или если оставление зонда не предусмотрено инструкцией, погрузить рабочую часть зонда в среду и, прижав ее к внутренней стенке пробирки, вращать зонд 5-10 с, после чего зонд удалить, а пробирку плотно закрыть.

Перед проведением процедуры экстракции нуклеиновых кислот осадить капли материала со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием (1500-3000 об/мин. в течение 5 с), после чего аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе, избегая разбрызгивания и попадания материала на внутреннюю часть крышки.

Условия хранения и перевозки материала:

- при комнатной температуре — в течение 6 ч;
- при температуре 2–8°C — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

3. Соскобное отделяемое (мазок) из влагалища

Для взятия соскобного отделяемого и мазков используются специальные одноразовые зонды, зонды-тампоны, цитощетки.

Материал из влагалища берут в достаточном количестве. Допустимо умеренное присутствие примесей в виде слизи и крови. Рабочей частью зонда-тампона вращательным движением проводят по поверхности боковых стенок влагалища, максимально полно собирая отделяемое.

После взятия клинического материала погрузить рабочую часть зонда в транспортную среду, рекомендованную производителем тест-систем. Оставить рабочую часть зонда в пробирке с транспортной средой, отломив ее в области насечки (если инструкция к набору реагентов предусматривает это). В случае отсутствия насечки или если оставление зонда не предусмотрено инструкцией, погрузить рабочую часть зонда в среду и, прижав ее к внутренней стенке пробирки, вращать зонд 5-10 с, после чего зонд удалить, а пробирку плотно закрыть.

В случае использования транспортной среды с муколитиком («ТСМ») ее цвет может измениться за счет изменения рН.

Пробирку плотно закрывают крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и маркируют. Перед проведением процедуры экстракции нуклеиновых кислот осаждают капли материала со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием (1500–3000 об/мин в течение 5 с), после чего аккуратно перемешивают содержимое пробирки на вортексе, избегая разбрызгивания и попадания материала на внутреннюю часть крышки.

Условия хранения и перевозки материала

Определяются инструкцией к транспортной среде и набору реагентов для выделения и очистки нуклеиновых кислот.

При использовании **Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)**

- при комнатной температуре 18–25°C — в течение 28 суток;
- при температуре 2–8°C — в течение 3 месяцев;
- при температуре минус 20°C и ниже — длительно.

При использовании **Транспортной среды для мазков:**

- при комнатной температуре 18–25°C — в течение 48 часов;
- при температуре 2–8°C — в течение 7 суток;
- при температуре минус 20°C и ниже — длительно.

При использовании **Транспортной среды ТС-ЭДЭМ** из набора реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ЭДЭМ»:

- при комнатной температуре 18–25°C — в течение 48 часов;
- при температуре 2–8°C — в течение 14 суток;
- при температуре минус 20°C и ниже — длительно.

4. Соскобное отделяемое (мазок) из цервикального канала

Взятие материала

Доступ к цервикальному каналу обеспечивают с помощью стерильного гинекологического зеркала. Взятие материала производят с помощью цервикальной цитощетки в пробирку со специальной транспортной средой с муколитиком «ТСМ». Допустимо умеренное присутствие примесей в виде цервикальной слизи и крови. В ряде случаев возможно взятие материала с помощью универсального гинекологического зонда, однако при этом объем соскобного отделяемого будет меньше, а количество клеток может быть недостаточным.

Удаляют слизь и отделяемое влагалища с поверхности шейки матки стерильным марлевым тампоном, вводят рабочую часть цитощетки (зонда) в цервикальный канал и делают два-три полных оборота по часовой стрелке. Извлекают цитощетку и помещают ее рабочую часть, содержащую взятый материал, в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть цитощетки обламывают не более 1 см пластиковой основы и оставляют в пробирке с транспортной средой.

В случае невозможности обломить рабочую часть цитощетки или универсального зонда, следует максимально полно смыть клинический материал с их рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки.

Перед проведением процедуры экстракции нуклеиновых кислот тщательно перемешивают содержимое пробирки на вортексе для растворения слизи и осаждают капли материала со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием (1500–3000 об/мин в течение 5 с), после чего аккуратно перемешивают содержимое пробирки с помощью пипетирования.

Предварительная обработка проб не требуется.

Условия хранения и перевозки материала:

- при комнатной температуре — в течение 6 ч;
- при температуре 2–8°C — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

5. Моча

Взятие материала

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный флакон или контейнер на 50–60 мл. Сбор мочи проводится после тщательного туалета наружных половых органов, чтобы в мочу не попали выделения из них. Желательно закладывать тампон во влагалище перед сбором материала для предупреждения контаминации мочи отделяемым из влагалища. Также не следует производить сбор мочи во время менструации (для женщин). Для мужчин – при отборе пробы мочи, при мочеиспускании, необходимо полностью оттянув кожную складку, освободить наружное отверстие мочеиспускательного канала.

Предварительная обработка проб:

Взбалтывают флакон с мочой. Переносят 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильные одноразовые пробирки объемом 1,5 мл. Центрифугируют 5 мин. при 10000 g, при наличии большого количества солей ресуспендируют только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова концентрируют. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удаляют супернатант, не захватывая осадок. К осадку добавляют транспортную среду до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Условия хранения и перевозки материала и предварительно обработанных проб

- при температуре от 2 до 8°C - в течение 1 сут.;
- при температуре - 20°C - в течение 1 недели;
- при температуре - 70°C - длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

6. Соскобное отделяемое (мазок) из уретры

Взятие материала

Взятие материала производят с помощью зонда-тампона в пробирку с выбранной транспортной средой.

Перед взятием соскоба из уретры обрабатывают головку полового члена в области наружного отверстия уретры тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором. Производят массаж уретры. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удаляют их сухим тампоном. Вводят зонд в уретру на глубину 1–2 см. Несколькими вращательными движениями производят соскоб эпителиальных клеток и переносят зонд в пробирку с транспортной средой, обламывают и оставляют.

В случае отсутствия насечки погружают рабочую часть зонда в среду и, прижав ее к внутренней стенке пробирки, вращают зонд 5–10 секунд, после чего зонд удаляют, а пробирку плотно закрывают. Следует помнить, что в этом случае значительная часть материала может не попасть в пробирку с транспортной средой и материал будет неадекватным для исследования.

Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрывают крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и маркируют.

Перед проведением процедуры экстракции нуклеиновых кислот осаждают капли материала со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием (1500–3000 об/мин в течение 5 секунд), после чего аккуратно перемешивают содержимое пробирки на вортексе, избегая разбрызгивания и попадания материала на внутреннюю часть крышки.

v.251023

Отделяемое забирают в достаточном количестве. Допустимо умеренное присутствие примесей в виде слизи, крови и гноя.

Предварительная обработка проб не требуется.

Условия хранения и перевозки материала:

- при комнатной температуре — в течение 6 ч;
- при температуре 2–8°C — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

7. Сперма

Взятие материала

Перед получением спермы головку полового члена обрабатывают стерильным ватным тампоном. Забор материала осуществляют в специальный сухой стерильный контейнер на 50–60 мл. Крышку контейнера необходимо плотно закрутить, контейнер промаркировать. Материал в лабораторию доставляется в ускоренном режиме, в термосе при температуре +34 °С.

Требуется предварительная обработка проб.

Непосредственно перед выделением нуклеиновых кислот, используя наконечник с фильтром, переносят 0,05 мл спермы в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл и добавляют 0,15 мл транспортной среды, тщательно перемешивают пробу на вортексе.

Условия хранения материала:

- при комнатной температуре — в течение 6 часов;
- при температуре 2–8°C — в течение 1 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

8. Соскобное отделяемое (мазок) из полости носа

Взятие материала

Мазки (слизь) берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе. Тампон вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины. Затем тампон слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с защелкивающейся крышкой, содержащую соответствующую транспортную среду, и аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Предварительная обработка проб не требуется.

Условия хранения и перевозки материала:

- при комнатной температуре — в течение 6 ч;
- при температуре 2–8°C — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70°C — длительно;

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

9. Соскобное отделяемое (мазок) из ротоглотки

Взятие материала

Мазки берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку со специальной транспортной средой и аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Предварительная обработка проб не требуется.

Условия хранения материала:

- при комнатной температуре — в течение 6 ч;
- при температуре 2-8°C — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала

10. Мокрота

Взятие материала

Взятие материала осуществляют в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и завинчивающимися крышками объемом не менее 50 мл.

Требуется предварительная обработка проб.

Перед выделением нуклеиновых кислот необходимо провести разжижение мокроты, используя раствор «Муколизин» (Na₂HPO₄ 77,4 мМ, NaH₂PO₄ 22,6 мМ, бета-МЭ 99,4 мМ, 5%-ный азид натрия в конечной концентрации 0,05%). В емкость с мокротой добавляют «Муколизин» в соотношении 5:1 (5 частей «Муколизина» к 1 части мокроты), ориентируясь по градуировке емкости, и стерильные стеклянные бусы. В процессе разжижения мокроты (20–30 минут) емкость периодически встряхивают. Затем автоматической пипеткой, используя накопник с фильтром, отбирают 1 мл разжиженной мокроты, помещают в пробирку с завинчивающейся крышкой или в микроцентрифужную пробирку с защелкой на 1,5 мл и центрифугируют при 5000–7000 g (8000–10000 об/мин на центрифуге в течение 10 минут. Удаляют 0,8 мл надосадочной жидкости, осадок клеток перемешивают с 0,2 мл оставшейся жидкости.

Допускается выделение ДНК/РНК из 0,1 мл разжиженной мокроты без стадии центрифугирования.

Условия хранения и перевозки материала и предварительно обработанных проб:

- при комнатной температуре — в течение 6 часов;
- при температуре 2–8°C — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

11. Слюна

Взятие материала

Перед получением слюны проводят трехкратное полоскание полости рта физиологическим раствором. Слюну забирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Предварительная обработка проб не требуется.

Условия хранения материала:

- при комнатной температуре — в течение 6 ч;
- при температуре 2–8°C — в течение 1 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

12. Бронхоальвеолярный лаваж или промывные воды бронхов

Взятие материала

Взятие материала осуществляют в одноразовые, плотно заворачивающиеся пробирки объемом 50 мл.

Требуется предварительная обработка проб.

Промывные воды бронхов или бронхоальвеолярный лаваж перемешивают переворачиванием пробирки. Автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл клинического материала, помещают в пробирку с заворачивающейся крышкой или пробирку с защелкой на 1,5 мл и центрифугируют при 10000 об/мин на центрифуге в течение 10 минут. Удаляют 0,9 мл надосадочной жидкости, осадок клеток перемешивают с 0,1 мл оставшейся жидкости.

Условия хранения и перевозки материала и предварительно обработанных проб:

- при температуре 2–8°C — в течение 1 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

13. Пунктат Бубона

Взятие материала

Взятие материала производят стерильным шприцем. Если бубон имеет сохранившуюся кожу (не вскрывшийся бубон), то ее протирают предварительно спиртом. Пункцию бубона производят как в его центре, так и на периферии. Из вскрывшегося бубона материал забирают в местах с сохраненной тканью, а также берут отделяемое бубона. Исследуемый материал в количестве 0,1–0,3 мл помещают в пробирку со специальной транспортной средой.

Предварительная обработка проб не требуется.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре 2–8°C — в течение 1 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

14. Материал из визикул и пустул

Взятие материала

Перед взятием материала кожные элементы очищают ватным тампоном, смоченным эфиром или спиртом, затем прокалывают их у основания стерильной иглой или тонким капилляром пастеровской пипетки. Для ускорения поступления материала элемент сверху надавливают пинцетом. Корку или верхнюю часть везикул отделяют от кожи иглой, скальпелем. Исследуемый материал помещают в пробирку с транспортной средой.

Предварительная обработка проб не требуется.

Условия хранения материала:

- при комнатной температуре — в течение 6 часов;
- при температуре 2–8°C — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

15. Амниотическая жидкость

Взятие материала

Взятие амниотической жидкости производится при проведении амниоцентеза с помощью одноразовых игл, в одноразовые пластиковые стерильные сухие пробирки объемом 1,5 мл в количестве не менее 1,0 мл.

Условия хранения:

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

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

16. Синовиальная жидкость

Взятие материала

Синовиальную жидкость (СЖ) следует получать с помощью одноразовых игл, в одноразовые пластиковые сухие пробирки объемом 20,0 мл в количестве не менее 5,0 мл (лучше 10 мл). Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать. Возможен сбор и доставка проб в стерильном шприце.

Контейнеры плотно закрываются, маркируются.

Условия хранения материала:

- при комнатной температуре — в течение 6 часов;
- при температуре 2–8°C — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

17. Фекалии

Взятие материала

Пробу в количестве примерно 1-3 г (1-3 мл) отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками переносят в специальный стерильный флакон. Небольшое количество (4-5 раз) забирать из нескольких мест одноразовой лопаточкой, прикрепленной к крышке

v.251023

контейнера, в который, берется материал. Если кал жидкий, то следует перелить небольшое количество в контейнер.

Требуется предварительная обработка проб.

При исследовании нативных фекалий без предшествующего замораживания готовят фекальную суспензию (при водянистой консистенции фекалий суспензию не готовят).

Приготовление фекальной суспензии

В соответствующее пробам количество микроцентрифужных пробирок (объемом 1,5 мл) вносят 0,8 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида). В каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром (или одноразовыми лопатками) вносят 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендируют на вортексе до образования гомогенной суспензии.

При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к 10–20%-ной суспензии фекалий в фосфатном буфере (или стерильном изотоническом растворе натрия хлорида) добавляют глицерин в конечной концентрации 10–15%. Подготовленные таким образом пробы замораживают только после тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30–40 минут.

Приготовление бактериальной фракции фекалий для выявления бактериальных агентов

Для приготовления бактериальной фракции фекалий используют фекалии водянистой консистенции, свежеприготовленную суспензию фекалий или суспензию, подвергавшуюся замораживанию с глицерином.

Пробирки с суспензией (водянистыми фекалиями) центрифугируют при 7000–12000 g (10000–13000 об/мин на центрифуге в течение 5 минут. Отдельным наконечником с фильтром из каждой пробирки отбирают бактериальную фракцию в объеме 0,05 мл (верхняя бело-желтая часть образовавшегося осадка). При отсутствии осадка или бело-желтого пограничного слоя между осадком и супернатантом отбирают 0,1 мл со дна пробирки или с границы осадка или супернатанта, соответственно. Отобранную часть пробы, содержащую высокую концентрацию бактерий, переносят в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,8 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида). Проводят тщательное ресуспендирование осадка на вортексе с последующим центрифугированием при 7000–12000 g (10000–13000 об/мин на центрифуге в течение 15 минут.

Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют на вортексе в 0,3 мл фосфатного буфера (стерильного изотонического раствора натрия хлорида).

Приготовление осветленного экстракта фекалий для выявления вирусных агентов

Для приготовления осветленного экстракта фекалий используют фекалии водянистой консистенции, свежеприготовленную суспензию фекалий или суспензию, подвергавшуюся замораживанию с глицерином.

Взвесь фекалий интенсивно гомогенизируют на вортексе. Осветляют полученную суспензию путем центрифугирования при 10000 g 12000 об/мин на центрифуге в течение 5 минут. Супернатант (0,1 мл) смешивают с отрицательным контрольным образцом (50%-ная сыворотка крови крупного рогатого скота, разведенная фосфатно-солевым буфером, состав которого указан выше) (0,1 мл) в соотношении 1:1 и используют непосредственно для выделения ДНК или РНК. При необходимости хранения супернатант отбирают в отдельную одноразовую пробирку.

Условия хранения и перевозки материала и предварительно обработанных проб:

v.251023

Образцы нативных фекалий:

- при комнатной температуре — в течение 6 часов;
- при температуре 2–8°C — в течение 3 суток.

Фекальная суспензия с глицерином, бактериальная фракция и осветленный фекальный экстракт:

- при температуре минус 20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно.

18. Спинномозговая жидкость (ликвор)

Взятие материала

Спинномозговую жидкость в количестве не менее 1 мл собирают, используя одноразовые иглы, в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

Предварительная обработка проб не требуется.

При необходимости можно проводить концентрирование. Для концентрирования содержащих вирусы клеток и бактерий при некоторых инфекционных заболеваниях (ЛЗН, ВКЭ, лептоспироз, боррелиоз, токсоплазмоз) центрифугируют 1 мл спинномозговой жидкости при 10000–11000 об/мин и исследуют осадок и 100 мкл надосадочной жидкости.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре 2–8°C — в течение 1 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

19. Слезная жидкость

Взятие материала

Слезную жидкость в количестве не менее 0,5 мл собирают, используя одноразовые пластиковые пипетки, в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Для усиления слезоотделения проводят провокацию слезоточивым веществом (обычно используют нашатырный спирт).

Предварительная обработка проб не требуется.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре 2–8°C — в течение 1 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

20. Отделяемое конъюнктивы

Взятие материала

Материал забирают сухим стерильным ватным тампоном на пластиковой основе под местной анестезией (2 капли раствора декаина). Оттянув нижнее веко, вращающими движениями проводят зонд 4–5 раз по конъюнктиве, захватывая внешний и внутренний углы глаза.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в одноразовую стерильную пробирку с защелкивающейся крышкой объемом 2 мл, содержащую соответствующую транспортную среду. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части

и оставляют рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Предварительная обработка проб не требуется.

Условия хранения и перевозки материала

- при комнатной температуре — в течение 6 часов;
- при температуре 2–8°C — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

21. Биопсийный и аутопсийный материал

Взятие материала

Материал забирают из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с поврежденным местом участка. Забирают стерильным индивидуальным инструментом. Кусочки ткани диаметром не более 5 мм помещают в одноразовые стерильные пробирки объемом 2 мл, содержащих соответствующую транспортную среду. Пробирку плотно закрывают. Макроаутопат помещают в контейнер с физиологическим раствором или специальной транспортной средой.

Требуется предварительная обработка проб.

Микробиоптаты (пунктаты) или микроаутоптаты печени, селезенки, предстательной железы, желудочно-кишечного тракта, шейки матки и т.д., помещенные в микропробирки с закручивающимися крышками или в пробирки объемом 1,5 мл с защелкой, содержащие 0,1 мл транспортной среды, предобработки не требуют. Далее выделение нуклеиновых кислот проводят в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

Макробиоптаты или макроаутоптаты.

При выявлении вирусных агентов кусочки ткани массой 0,1–1 г помещают в охлажденную фарфоровую ступку и добавляют охлажденный изотонический раствор хлорида натрия объемом 0,5–1 мл. Измельчают стерильными ножницами с последующим растиранием пестиком. Через ватный тампон отбирают надосадочную жидкость (0,1–0,2 мл) стерильным накопником с фильтром в стерильные микропробирки.

При выявлении бактериальных агентов процесс подготовки макробиоптатов (макроаутоптатов) аналогичен, только ступку и изотонический раствор не охлаждают. По другому способу биоптат непосредственно перед выделением нуклеиновых кислот помещают в жидкий азот, затем аккуратно измельчают его пестиком в предварительно охлажденной жидким азотом фарфоровой ступке. Взвешивают 100 мг кусочков ткани и растирают их в ступке в жидком азоте до порошка. Затем для выделения РНК порошок переносят в гомогенизатор и следуют инструкции по выделению РНК. Для выделения ДНК к полученному порошку добавляют равный объем стерильного физиологического раствора (0,1 мл), тщательно перемешивают и отбирают необходимый объем материала согласно инструкции для выделения ДНК.

Фарфоровая посуда, а также гомогенизаторы должны быть предварительно обработаны хромпиком и простерилизованы. При гомогенизации нескольких образцов необходимо после каждой пробы протирать поверхность стола 0,2%-ным раствором ДП-2Т, затем водой и 70%-ным этиловым спиртом и менять перед обработкой следующей пробой перчатки.

Условия хранения и перевозки материала

Образцы биопсийного и аутопсийного материала, предназначенного для выделения ДНК или РНК:

- при комнатной температуре — в течение 6 часов;

- при температуре 2–8°C — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

22. Клещи и эктопаразиты (вши, блохи)

Взятие материала

После взятия и доставки материала в лабораторию клещей, блох и вшей обрабатывают эфиром до обездвижения, нанося каплю эфира на ватно-марлевую пробку. Материал может быть объединен в пулы в зависимости от вида, места и даты сбора и помещен в сухие чистые пробирки объемом 1,5 мл. При необходимости проводят исследования отдельных особей.

Требуется предварительная обработка проб:

Для приготовления суспензий клещей, блох и вшей используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик или автоматический гомогенизатор. В случае гомогенизации напитавшихся клещей в ступке их предварительно прокалывают стерильной одноразовой иглой в нескольких местах для выхода крови. Клещей растирают в 300 мкл 0,15 М раствора хлорида натрия, затем полученную суспензию центрифугируют при 12000 об/мин 30 сек. Полученный супернатант используют для выделения РНК/ДНК.

Условия хранения и перевозки материала и предварительно обработанных проб:

- при температуре минус 20°C — в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70°C или в сосуде Дьюара с жидким азотом — длительно.

Обработанный материал (после гомогенизации и осветления) хранится длительно при температуре минус 70°C или в сосуде Дьюара с жидким азотом.

Допускается только однократное замораживание/оттаивание материала.

23. Вода, стоки, смывы

Взятие материала

Водопроводную воду и воду из поверхностных водоемов для исследования берут в количестве 1 л на одну пробу в двух объемах по 500 мл в стерильную посуду с непромокаемой пробкой. Из водопроводных кранов отбор проб воды производят после предварительного обжигания их спиртовым факелом и спуска воды в течение 10 минут при полном открытии крана.

Хозяйственно-бытовые сточные воды отбирают для исследования двумя способами: в объеме 1 л в двух емкостях по 500 мл или тампонами, приготовленными из марлевых салфеток размером 10x15 см в 10–15 слоев. Последние закрепляют у места забора воды, через 1 сутки помещают в стерильную банку, содержащую физиологический раствор.

Смывы с поверхностей берут стерильными ватными тампонами или марлевыми салфетками. Перед взятием смывов тампоны или салфетки смачивают стерильным физиологическим раствором. После взятия смыва тампон (салфетку) погружают в емкость с физиологическим раствором.

Требуется предварительная обработка проб.

При выявлении бактериальных агентов и возбудителей микозов подготовку проб осуществляют методом дробного центрифугирования или вакуумной фильтрации на фильтры с размерами пор 0,45 и 0,65, 0,8, 1,2 мкм, соответственно. При выявлении вирусных агентов для подготовки проб используют только вакуумную фильтрацию на фильтры с размерами пор 0,2 мкм.

Дробное центрифугирование

Из отобранных образцов переносят по 125 мл в 4 центрифужных стакана объемом 250 мл с завинчивающимися крышками (или по 80 мл в 6 центрифужных пробирок, или по 50 мл в 10 центрифужных пробирок) и центрифугируют в течение 15 минут при 10000 g (12000 об/мин). После этого осадок в каждом стакане (пробирке) ресуспендируют в 0,2 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Полученные суспензии переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл или 2,0 мл и центрифугируют при 10000 g (12000 об/мин) на центрифуге в течение 1 минуты. Надосадочную жидкость отбирают наконечником с фильтром в микропробирку объемом 1,5 мл. Для выделения ДНК используют 0,1–0,2 мл надосадочной фракции.

Возможно центрифугирование одной пробы в одном центрифужном стакане (пробирке). Для этого в центрифужный стакан (пробирку) переносят пробу в объеме 50–125 мл и центрифугируют в течение 15 минут при 10000 g (12000 об/мин), надосадочную жидкость удаляют, и в стакан (пробирку) снова добавляют соответствующий объем исследуемой пробы. Аналогичным образом центрифугируют весь объем исследуемой пробы. После последнего центрифугирования осадок ресуспендируют в 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида и центрифугируют при 10000 g (12000 об/мин) в течение 1 минуты. Надосадочную жидкость отбирают наконечником с фильтром в микропробирку объемом 1,5 мл. Для выделения ДНК используют 0,1–0,2 мл надосадочной фракции.

Вакуумная фильтрация

Для исследования используют стерильные фильтры с соответствующими размерами пор. В случае сильной загрязненности исходного образца воды механическими или масляными примесями, определяемыми визуально, его предварительно фильтруют на стеклянной воронке через стерильный ватно-марлевый или бумажный фильтр. Подготовленную таким образом воду пропускают через мембранный фильтр. После окончания фильтрации мембранные фильтры переносят обожженным анатомическим пинцетом в стерильный флакон (чашку Петри) или стерильный пластиковый пакет типа «Вихрь» объемом 100 мл, содержащих 10 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Воду после фильтрации обеззараживают добавлением сухой хлорной извести из расчета 200 г на 1 л. Для сорбции бактерий и вирусов с фильтра флакон встряхивают в течение 10 мин с помощью шейкера, фильтр внутри пакета типа «Вихрь» растирают вручную в течение 1 мин, фильтр, помещенный в чашку Петри, разрезают на мелкие куски ножницами инкубируют при покачивании в течение 10 минут. Далее смыв с поверхности фильтра переносят в стерильную пробирку. Для исследования методом ПЦР отбирают 1 мл в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и центрифугируют при 10000 g (12000 об/мин) на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, Германия) в течение 10 минут. При выявлении бактериальных агентов оставляют 0,1 мл надосадочной жидкости, в которой ресуспендируют осадок. Из полученной суспензии проводят выделение ДНК. При выявлении вирусных агентов для выделения нуклеиновых кислот используют 0,1–0,2 мл надосадочной жидкости.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре 2–8°C — в течение 1 суток;
- при температуре минус 20°C — в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.