



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 13 марта 2019 года № ФСР 2009/05514

На медицинское изделие

Реагент для транспортировки и хранения клинического материала
"Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)" по ТУ 9398-098-01897593-2009

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиревская, д. 3А

Производитель

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиревская, д. 3А

Место производства медицинского изделия

см. приложение

Номер регистрационного досье № РД-26124/11212 от 01.03.2019

Класс потенциального риска применения медицинского изделия **2а**

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности **21.20.23.110**

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 13 марта 2019 года № 1987
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения



Д.Ю. Павлюков

0042655

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 13 марта 2019 года

№ ФСР 2009/05514

Лист 1

На медицинское изделие

Реагент для транспортировки и хранения клинического материала "Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)" по ТУ 9398-098-01897593-2009:

Форма 1 включает реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» объемом 50 мл, 1 флакон;

Форма 2 включает реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» объемом 0,5 мл, 100 пробирок;

Форма 3 включает реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» объемом 0,5 мл, 20 пробирок;

Форма 4 включает реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» объемом 0,5 мл, 1 пробирка;

Форма 5 включает реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» объемом 2,0 мл, 1 пробирка.

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.

Z



Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения

Д.Ю. Павлюков

0054572

УТВЕРЖДАЮ
Зам. директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека


В.Г. Акимкин
«26» Октября 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению реагента для транспортировки и
хранения клинического материала

«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Транспортная среда с муколитиком (ТСМ) предназначена для транспортировки и хранения соскобного материала и отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, прямой кишки, конъюнктивы глаз, а также эрозивно-язвенных элементов слизистых и кожи человека для последующего исследования на возбудители инфекций, передаваемых половым путем (ИППП) и других инфекций органов репродукции методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и реакцией транскрипционной амплификации РНК (НАСБА) с использованием соответствующих комплектов реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ОПИСАНИЕ И ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Транспортная среда с муколитиком (ТСМ) представляет собой готовый к применению стерильный буферно-солевой раствор розового цвета с добавлением муколитика, консерванта и стабилизатора. Муколитик обеспечивает разжижение слизи, что способствует более эффективному и гомогенному смешиванию клинического материала с транспортной средой. Консервант и стабилизатор препятствуют росту неспецифической микрофлоры и преждевременному лизису клеток, обеспечивая стабильность ДНК и РНК микроорганизмов и вирусов длительное время в широком температурном диапазоне.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Реагент выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает реагент Транспортная среда с муколитиком (ТСМ) объемом 50 мл, 1 флакон.

Форма 2 включает реагент Транспортная среда с муколитиком (ТСМ) объемом 0,5 мл, 100 пробирок.

Форма 3 включает реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» объемом 0,5 мл, 20 пробирок.

Форма 4 включает реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» объемом 0,5 мл, 1 пробирка.

Форма 5 включает реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» объемом 2,0 мл, 1 пробирка.

Форма 1: **REF** 952; **REF** M-0981-1; Форма 2: **REF** 953; **REF** 4636; **REF** M-0982-100;

Форма 3: **REF** M-0983-20 Форма 4: **REF** 1442; **REF** M-0984;

Форма 5: **REF** 2310; **REF** M-0985 / **VER** 26.10.17 / стр. 2 из 8

Формы комплектации 1 и 2 рассчитаны на 100 проб. Форма комплектации 3 рассчитана на 20 проб. Формы комплектации 4 и 5 рассчитаны на 1 пробу.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Процедура взятия клинического материала проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, 2012 г.). Для исследования используется следующий клинический материал: соскобы и отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, прямой кишки, конъюнктивы глаз, а также эрозивно-язвенных элементов слизистых оболочек и кожи человека.

Клинический материал, помещенный в транспортную среду с муколитиком (ТСМ) в плотно закрытой пробирке можно транспортировать и хранить:

- при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) до 28 сут;
- при температуре от 2 до 8°С до 3 мес;
- для более длительного хранения образцы заморозить при температуре минус 20°С и ниже.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) 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».

При работе необходимо всегда выполнять следующие

требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку¹, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Реагент предназначен для одноразового применения для проведения исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).
- Реагент готов к применению согласно данной инструкции. Применять реагент строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Не использовать реагент, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать реагент, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

¹ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

Форма 1: REF 952; REF M-0981-1; Форма 2: REF 953; REF 4636; REF M-0982-100;

Форма 3: REF M-0983-20 Форма 4: REF 1442; REF M-0984;

Форма 5: REF 2310; REF M-0985 / VER 26.10.17 / стр. 4 из 8

- Не использовать реагент по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводить только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности реагент безопасен.

Специфические воздействия реагент на организм человека:

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ

Для формы комплектации 1.

1. Автоматический дозатор на 200–1000 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
2. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки типа «Эппендорф» на 2,0 мл (например, «Ахуген», США).
3. Стерильные наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным барьером на 1000 мкл (например, «Ахуген», США).

Для всех форм комплектации.

4. Одноразовые стерильные зонды (тампоны, цитощетки), предназначение для получения отделяемого слизистых

Форма 1: **REF** 952; **REF** M-0981-1; Форма 2: **REF** 953; **REF** 4636; **REF** M-0982-100;

Форма 3: **REF** M-0983-20 Форма 4: **REF** 1442; **REF** M-0984;

Форма 5: **REF** 2310; **REF** M-0985 / **VER** 26.10.17 / стр. 5 из 8

оболочек урогенитального тракта (цервикального канала, влагалища, уретры), ротоглотки, прямой кишки, а также эрозивно-язвенных элементов слизистых и кожи.

ПОРЯДОК РАБОТЫ

Пункт 1 выполнять только при использовании формы 1.

1. Соблюдая правила асептики расфасовать по 0,5 мл транспортной среды с муколитиком (ТСМ) в полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл. Пробирки плотно закрыть и хранить до использования при температуре от 2 до 25 °С.
2. Перед открыванием пробирок стряхнуть капли жидкости со стенок и внутренней части крышки на дно.
3. Погрузить рабочую часть зонда с клиническим материалом в транспортную среду с муколитиком (ТСМ) и, отломив её в области насечки (если имеется), оставить в пробирке. В случае отсутствия насечки, 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.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности 12 мес. Реагент с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. При температуре от 2 до 25 °С.

Хранение. При температуре от 2 до 25 °С.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество реагента «**Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)**» направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru².

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению реагента, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации реагента, рекомендуется направить сообщение в отдел по работе с рекламациями по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника №1»
Управления делами Президента
Российской Федерации

Е.В. Ржевская

² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

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

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 11.04.12г. № 1715-Пп/12

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека

В.И.Покровский
«24» февраля 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL»

АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 3 |
| НАЗНАЧЕНИЕ | 3 |
| ПРИНЦИП МЕТОДА | 3 |
| ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ..... | 6 |
| АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ..... | 7 |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ | 7 |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ..... | 9 |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.. | 11 |
| ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК..... | 12 |
| ФОРМАТ FRT | 13 |
| СОСТАВ..... | 13 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 15 |
| ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ..... | 16 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»..... | 17 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации | 17 |
| А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT | 17 |
| А2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F | 18 |
| Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» | 18 |
| АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 19 |
| СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ..... | 26 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из исследуемых образцов | 28 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Таблица приготовления реакционных смесей..... | 35 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ..... | 36 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

| | |
|--|--|
| ВК+ | - положительный контроль амплификации образца ВКО |
| ВКО STI-87 | - внутренний контрольный образец |
| ДНК | - дезоксирибонуклеиновая кислота |
| К- | - отрицательный контроль ПЦР |
| К+ | - положительный контроль ПЦР |
| ОК | - отрицательный контроль экстракции |
| ОКО | - отрицательный контрольный образец |
| ПКО | - положительный контрольный образец |
| ПЦР | - полимеразная цепная реакция |
| РНК | - рибонуклеиновая кислота |
| ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора | - Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека |
| FRT | - флуоресцентная детекция в режиме «реального времени» |

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Bordetella multi-FL*» предназначен для выявления и дифференциации специфических фрагментов генома возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Материалом для исследования служат мазки со слизистой нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки, а также культуры микроорганизмов.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Полный анализ включает следующие этапы: экстракцию ДНК возбудителей из образцов клинического материала, амплификацию участков геномов микроорганизмов и гибридизационно-флуоресцентную детекцию сигнала, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция ДНК микроорганизмов из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), использование которого позволяет контролировать качество

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

выполнения процедуры исследования для каждого образца. Амплификация проводится при участии олигонуклеотидов (праймеров), специфичных к ДНК-мишеням, и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарными участками амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала во время амплификации.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся четыре реакции – амплификация консервативного участка гена *ptxA*, кодирующего коклюшный токсин, представленного в геномах *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* и *Bordetella bronchiseptica*; идентификация специфических участков в геномах *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica*, а также амплификация последовательности внутреннего контрольного образца:

| Канал детекции | FAM | JOE | ROX | Cy5 |
|----------------|--------------|--|---|--|
| Реакция | Детекция ВКО | Обнаружение гена коклюшного токсина, <i>ptxA</i> | Идентификация <i>Bordetella pertussis</i> | Идентификация <i>Bordetella bronchiseptica</i> |

В случае обнаружения в образце коклюшного токсина (канал для флуорофора JOE) делается вывод о наличии одного из микроорганизмов, принадлежащих роду *Bordetella* (*B.pertussis*, *B.parapertussis* или *B.bronchiseptica*).

В случае одновременного получения положительных результатов по каналам для флуорофоров JOE и ROX делается вывод о наличии в образце *Bordetella pertussis*. В случае одновременного получения положительных результатов по каналам для флуорофоров JOE и Cy5 делается вывод о наличии в образце *Bordetella bronchiseptica*.

Сделать вывод о наличии в исследуемом образце *Bordetella parapertussis* можно в случае обнаружения в образце коклюшного токсина (канал для флуорофора JOE) и получения отрицательных результатов в реакциях идентификации *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* при условии

содержания достаточного количества ДНК *Bordetella*, что определено пороговыми значениями, указанными в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 4 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 5 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

Форма 6 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 7 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2, 3 и 4 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала и амплификацию ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 5 и 6 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК/РНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 7 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Использование формы комплектации 7 производится только в соответствии с регламентом,

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность при исследовании мазков со слизистой нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки

| Возбудитель | Комплект для выделения ДНК/РНК | Комплект для амплификации и детекции | Аналитическая чувствительность ГЭ/мл ² |
|---|--------------------------------|---|---|
| <i>Bordetella pertussis</i> (возбудитель коклюша) | «РИБО-сорб» | «ПЦР-комплект» вариант FRT, вариант FRT-100 F | 1x10 ³ |
| | «РИБО-преп» | | 5x10 ² |
| | NucliSENS easyMAG | | 5x10 ² |
| <i>Bordetella parapertussis</i> (возбудитель паракоклюша) | «РИБО-сорб» | «ПЦР-комплект» вариант FRT, вариант FRT-100 F | 1x10 ³ |
| | «РИБО-преп» | | 5x10 ² |
| | NucliSENS easyMAG | | 5x10 ² |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> (возбудитель бронхисептикоза) | «РИБО-сорб» | «ПЦР-комплект» вариант FRT, вариант FRT-100 F | 1x10 ³ |
| | «РИБО-преп» | | 5x10 ² |
| | NucliSENS easyMAG | | 5x10 ² |

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК заявленных возбудителей. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Streptococcus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacteria tuberculosis* 27294 105, *Neisseria flava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *E. coli* ATCC, NCTC, 01577 27u7, *Enterococcus faecalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella Enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, а также геномной ДНК человека.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней,

² Чувствительность выражается в геномных эквивалентах (ГЭ) возбудителя в 1 мл пробы.

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».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранить в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.

- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков (ТУ 9398-083-01897593-2009) – реагент для хранения мазков из полости носа и ротоглотки.
2. Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (516CS01, COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у детей.
3. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (503CS01, COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых.
4. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы), в индивидуальной упаковке, стерильный (300202, Deltalab, Испания) – зонд для взятия мазков из ротоглотки у детей и взрослых.
5. 0,9% раствора натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатном буфере, рН 7,0 – в случае исследования культур микроорганизмов.
6. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (для форм комплектации 5 и 6).
7. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК/РНК.
8. Автоматическая станция для выделения ДНК/РНК (например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) – при использовании автоматических станций для экстракции

- нуклеиновых кислот (для форм комплектации 5 и 6).
9. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например, NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнитная силика) (bioMérieux, Франция)) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот (для форм комплектации 5 и 6).
 10. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
 11. Центрифуга/вортекс.
 12. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл).
 13. Одноразовые наконечники с фильтром до 10, 100, 200 мкл.
 14. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл и 0,1 мл.
 15. Холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
 16. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 17. Емкость для сброса наконечников.
 18. Программируемый амплификатор роторного типа (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) или амплификатор планшетного типа (например, iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad, США), «ДТ-96» «ДНК-Технология» и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
 19. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл – при работе с «ПЦР-комплектom» вариант FRT-100 F:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axugen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Все работы по взятию, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

Материалом для исследования служат:

- мазки со слизистой нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки,
- культуры микроорганизмов.

Взятие мазков со слизистой нижнего носового хода

Мазки берут сухим стерильным назофарингеальным вельюр-тампоном на пластиковом аппликаторе. Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с тампоном) помещают до места слома в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают и маркируют.

Взятие мазков из ротоглотки

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с вязкими тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки

ротоглотки.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вискозным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, маркируют.

ВНИМАНИЕ! При взятии мазков рекомендуется совмещать мазки из полости носа и ротоглотки в одной пробирке. Для этого сначала берут мазки разными зондами со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Допускается хранение клинического материала до проведения исследования в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед – при температуре не выше минус 16 °С.

Культуры микроорганизмов:

Колонию микроорганизмов ресуспендировать в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатном буфере, рН 7,0. Полученную суспензию использовать для дальнейшей работы.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Мазки со слизистой нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки: содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс g на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 или вариант 100 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Вариант 50</i> | | <i>Вариант 100</i> | |
|------------------------------|---|-------------------|---------------|--------------------|---------------|
| | | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
| Лизирующий раствор | Прозрачная бесцветная жидкость ³ | 22,5 | 1 флакон | 45 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 1 | Прозрачная бесцветная жидкость ³ | 20 | 1 флакон | 40 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 3 | Прозрачная бесцветная жидкость | 50 | 1 флакон | 100 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 4 | Прозрачная бесцветная жидкость | 20 | 1 флакон | 40 | 1 флакон |
| Сорбент | Суспензия белого цвета | 1,25 | 1 пробирка | 1,25 | 2 пробирки |
| РНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 5 пробирок | 0,5 | 10 пробирок |

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 или вариант 100 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Вариант 50</i> | | <i>Вариант 100</i> | |
|---------------------------------|---|-------------------|---------------|--------------------|---------------|
| | | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
| Раствор для лизиса | Прозрачная жидкость голубого цвета ⁴ | 15 | 1 флакон | 30 | 1 флакон |
| Раствор для преципитации | Прозрачная бесцветная жидкость | 20 | 1 флакон | 40 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 3 | Прозрачная бесцветная жидкость | 25 | 1 флакон | 50 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 4 | Прозрачная бесцветная жидкость | 10 | 1 флакон | 20 | 1 флакон |
| РНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 4 пробирки | 1,2 | 8 пробирок |

³ При хранении лизирующего раствора и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

⁴ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2.

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 4.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|--|-----------------------------------|-----------|----------------------------------|
| ПЦР-смесь-1-FL <i>Bordetella multi</i> раскапана под воск | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,008 | 55 пробирок объемом 0,2 мл |
| ПЦР-смесь-2-FL | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,77 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Bordetella spp.</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ПКО STI-88 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|------------|-----------------------------------|-----------|------------|
| ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |
| ВКО STI-87 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|--|--------------------------------|------------------|---------------|
| ПЦР-смесь-1-FL-F <i>Bordetella multi</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 5 пробирок |
| ПЦР-смесь-2-FRT | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |
| Полимераза (TaqF) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,06 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Bordetella spp.</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 2 пробирки |
| ПКО STI-88 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 2 пробирки |
| ТЕ-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 2 пробирки |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|----------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |
| ВКО STI-87 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 2 пробирки |

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования, в зависимости от типа используемого оборудования, изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Bordetella multi-FL*», разработанных ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Порядок работы с комплектами реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп», автоматической станцией **NucliSENS easyMAG** (производства bioMérieux, Франция) и набором реактивов и расходных материалов NucliSENS easyMAG описан в приложении 1.

ВНИМАНИЕ! Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО STI-87**. В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используют препарат **ОКО**.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL *Bordetella multi*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.
2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FL *Bordetella multi***.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Bordetella spp.***
 - в) **положительный контроль ПЦР ВКО (ВК+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО STI-88**.
 - г) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл пробы**, выделенной из **ОКО**.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

А2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

1. Разморозить необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL-F *Bordetella multi***. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL-F *Bordetella multi***, **ПЦР-смесью-2-FRT** и **полимеразой (TaqF)**, осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке **10*(N+1) мкл ПЦР-смеси-1-FL-F *Bordetella multi***, **5*(N+1) мкл ПЦР-смеси-2-FRT**, и **0,5*(N+1) мкл полимеразы (TaqF)**. (Расчетная таблица приготовления реакционных смесей в приложении 2).
4. Перемешать подготовленную смесь на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Bordetella spp.***
 - в) **положительный контроль ПЦР ВКО (ВК+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО STI-88**.
 - г) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** - внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из **ОКО**.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой

детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 1).

Таблица 1

Программа амплификации ДНК *Bordetella multi-FL*

| Цикл | Приборы роторного типа ⁵ | | | Приборы планшетного типа ⁶ | | |
|------|-------------------------------------|--|---------------|---------------------------------------|--|---------------|
| | Температура, °C | Время | Кол-во циклов | Температура, °C | Время | Кол-во циклов |
| 1 | 95 | 5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-100 F) | 1 | 95 | 5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-100 F) | 1 |
| 2 | 95 | 10 с | 10 | 95 | 10 с | 10 |
| | 60 | 20 с | | 60 | 25 с | |
| | 72 | 10 с | | 72 | 25 с | |
| 3 | 95 | 10 с | 35 | 95 | 10 с | 35 |
| | 60 | 20 с детекция флуоресц. сигнала | | 60 | 25 с детекция флуоресц. сигнала | |
| | 72 | 10 с | | 72 | 25 с | |

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на каждом из используемых каналов с установленной на соответствующем

⁵ например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов

⁶ например, «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), iCycler iQ5, iCycler iQ (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов

уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип анализа результатов амплификации следующий:

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам (FAM, JOE, ROX и Cy5):

| Канал для флуорофора | FAM | JOE | ROX | Cy5 |
|----------------------|--------------|--|---|--|
| Реакция | Детекция ВКО | Обнаружение гена коклюшного токсина, <i>ptxA</i> | Идентификация <i>Bordetella pertussis</i> | Идентификация <i>Bordetella bronchiseptica</i> |

- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента гена коклюшного токсина, имеющегося в геномах *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* и *Bordetella bronchiseptica*;
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации специфического участка генома *Bordetella pertussis*;
- по каналу для флуорофора Cy5 регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации специфического участка генома *Bordetella bronchiseptica*;
- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО STI-87.

Результат амплификации по каналу считается **положительным**, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в режиме реального времени S-образную форму, однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, и значение порогового цикла *Ct* для данного канала менее указанного граничного, **отрицательным** – в случае отсутствия кривой типичной формы, не пересекающейся с пороговой линией (нет значения *Ct*) или если определено значение порогового цикла *Ct*, превышающее указанное граничное значение.

ВНИМАНИЕ! Граничные пороговые значения *Ct* указаны во вкладыше, **прилагаемом к набору реагентов**, а также в «Методических Рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша

(*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для положительных и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 2).

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| Конт-роль | Контролируе-мый этап ПЦР-исследования | Значение порогового цикла, <i>Ct</i> | | | |
|-----------|---------------------------------------|--|--|--|--|
| | | FAM | JOE | ROX | Cy5 |
| | | Детекция ВКО | Обнаружение коклюшного токсина | Идентификация <i>Bordetella pertussis</i> | Идентификация <i>Bordetella bronchiseptica</i> |
| OK | Экстракция ДНК/РНК | Определено значение <u>меньше</u> граничного | <u>Отсутствует</u> | <u>Отсутствует</u> | <u>Отсутствует</u> |
| K- | ПЦР | <u>Отсутствует</u> | <u>Отсутствует</u> | <u>Отсутствует</u> | <u>Отсутствует</u> |
| BK+ | ПЦР | Определено значение <u>меньше</u> граничного | <u>Отсутствует</u> | <u>Отсутствует</u> | <u>Отсутствует</u> |
| K+ | ПЦР | <u>Отсутствует</u> | Определено значение <u>меньше</u> граничного | Определено значение <u>меньше</u> граничного | Определено значение <u>меньше</u> граничного |

Принцип интерпретации результатов:

Интерпретация результатов ПЦР-исследования по выявлению и идентификации возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) проводится на основании сочетания результатов анализа амплификации в соответствии с таблицей 3.

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

| Варианты | FAM | JOE | ROX | Cy5 | Результат |
|----------|---|--|---------------------|---------------------|---|
| | Значение порогового цикла, Ct | | | | |
| 1 | <u>Отсутствует или больше порогового значения</u> | <u>Отсутствует или присутствует, но больше порогового значения</u> | <u>Отсутствует</u> | <u>Отсутствует</u> | Невалидный |
| 2 | <u>Меньше порогового значения</u> | <u>Отсутствует</u> | <u>Отсутствует</u> | <u>Отсутствует</u> | <i>B.pertussis</i> <i>B.parapertussis</i> <i>B.bronchiseptica</i> НЕ обнаружены |
| 3 | <u>Присутствует</u> /либо <u>Отсутствует</u> | <u>Присутствует</u> | <u>Присутствует</u> | <u>Отсутствует</u> | Обнаружена ДНК: <i>B.pertussis</i> |
| 4 | <u>Присутствует</u> / либо <u>Отсутствует</u> | <u>Присутствует</u> | <u>Отсутствует</u> | <u>Присутствует</u> | Обнаружена ДНК: <i>B.bronchiseptica</i> |
| 5 | <u>Присутствует</u> /либо <u>Отсутствует</u> | <u>Присутствует и меньше порогового значения</u> | <u>Отсутствует</u> | <u>Отсутствует</u> | Обнаружена ДНК: <i>B.parapertussis</i> |
| 6 | <u>Меньше порогового значения</u> | <u>Присутствует, но больше порогового значения</u> | <u>Отсутствует</u> | <u>Отсутствует</u> | Обнаружена ДНК <i>Bordetella</i> spp: <i>B.pertussis</i> , или <i>B.parapertussis</i> , или <i>B.bronchiseptica</i> . Для проведения видового типирования необходимо повторное взятие материала |
| 7 | <u>Меньше порогового значения</u> | <u>Отсутствует</u> | <u>Присутствует</u> | <u>Отсутствует</u> | При повторении результата в ПЦР считать сомнительным |
| 8 | <u>Меньше порогового значения</u> | <u>Отсутствует</u> | <u>Отсутствует</u> | <u>Присутствует</u> | При повторении результата в ПЦР считать сомнительным |

ВНИМАНИЕ! Пороговые значения Ct указаны в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL» и вкладыше к набору реагентов «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL».

- ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* **не обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров **JOE**, **ROX** и **Cy5** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM**) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанного граничного.
- **Обнаружена** ДНК *B. pertussis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров **JOE** и **ROX** определяется значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
- **Обнаружена** ДНК *B. bronchiseptica*, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров **JOE** и **Cy5** определяется значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
- **Обнаружена** ДНК *B. parapertussis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** определено значение *Ct* меньше порогового и отсутствуют значения порогового цикла *Ct* по каналам для флуорофоров **ROX** и **Cy5**. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для

- ВКО (**FAM**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
- Если для исследуемой пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** определено значение Ct больше порогового и отсутствуют значения порогового цикла Ct по каналам для флуорофоров **ROX** и **Cy5**, а по каналу для ВКО (**FAM**) определено значение порогового цикла Ct , не превышающее указанного граничного, можно сделать вывод, что **обнаружена ДНК одного из представителей рода *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*)**, но для проведения видовой идентификации количества экстрагированной ДНК недостаточно, и при необходимости идентификации требуется повторное взятие клинического материала.
 - Если для исследуемой пробы в таблице результатов отсутствует значение порогового цикла Ct по каналу для флуорофора **JOE**, но определяется значение порогового цикла Ct по каналу для флуорофора **ROX** или **Cy5**, а по каналу для ВКО (**FAM**) значение порогового цикла Ct не превышает указанное (граничное) значение, требуется повторное исследование данной пробы с этапа ПЦР. При повторении результата считать данную пробу **сомнительной** и рекомендовать повторить взятие клинического материала для исследования.
 - Результат анализа считается **невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct по каналам для флуорофоров **ROX** и **Cy5**, по каналу для флуорофора **JOE** значение Ct отсутствует или превышает указанное граничное, и по каналу для ВКО (**FAM**) значение Ct также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить

амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.

2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) по каналам для флуорофоров **JOE**, **ROX** и **Cy5** и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по любому из каналов зафиксировано значение порогового цикла *C_t*, необходимо повторить исследование для всех положительных образцов начиная с этапа экстракции, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника возможной контаминации.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. Для форм комплектации 1, 2, 5 (вариант FRT) – 9 мес. Для форм комплектации 3, 4, 6 (вариант FRT-100 F) – 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

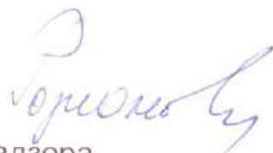
Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-2-FRT, ПЦР-смесь-1-FL-F *Bordetella* multi и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FL *Bordetella* multi и ПЦР-смесь-1-FL-F *Bordetella* multi хранить в защищенном от света месте.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)⁷.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»



А.Б. Жебрун

⁷ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для проведения экстракции ДНК/РНК из образцов).

А. При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб»
Объем клинического материала для экстракции ДНК – 100 мкл.

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.
 2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку по **450 мкл лизирующего раствора** и по **10 мкл ВКО STI-87**. Промаркировать пробирки.
 3. В пробирки с **лизирующим раствором** и **ВКО STI-87** внести по **100 мкл исследуемых проб**, используя наконечники с фильтром. Перемешать пипетированием.
- В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.
4. Плотные закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), центрифугировать при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в другие пробирки.
 5. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.
 6. Центрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс об/мин в течение 30 с на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

7. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Центрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя п. 8.
10. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, центрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
11. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
12. В пробирки добавить по **50 мкл РНК-буфера**, используя наконечники с фильтром, свободные от РНКаз. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой 60 °С на 2-3 мин. Перемешать на вортексе и центрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12-13 тыс об/мин) в течение 1 мин.

Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

Отбирать раствор для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С, более длительно при температуре не выше минус 68 °С.

Б. При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»
ВНИМАНИЕ! Раствор для лизиса из данного набора реагентов имеет неприятный запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

Объем клинического материала для экстракции ДНК – 100 мкл.

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-87** и по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-87** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
5. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
6. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 13 тыс об/мин**.
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
9. Центрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.

11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
12. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат с температурой **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
16. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге.
17. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С, более длительно при температуре не выше минус 68 °С.

В. При использовании автоматической станции для нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (BioMerieux, Франция)

Объем клинического материала для ДНК – 100 мкл.

Вариант 1. Экстракция ДНК с лизисом образца вне прибора
Данный метод экстракции позволяет снизить расход буфера для лизиса NucliSens и предпочтительнее при работе с образцами клинического материала, содержащего сгустки (мокрота, аспираты).

Порядок работы

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции ДНК/РНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для экстракции ДНК/РНК (установить *Other*), объем образца (*Volume*) – **0,1 ml**, объем элюции (*Eluate*) – **25 µl**, тип образца (*Type*) – *Lysed*, очередность экстракции ДНК в образцах (*priority*) – *Normal*.
3. Создать новый протокол экстракции ДНК/РНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: ***On-board Lysis Buffer Dispensing – No, On-board Lysis Incubation – No.***
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество специализированных одноразовых пробирок, предназначенных для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая отрицательный контроль выделения). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-87**. Добавить в пробирки по **550 мкл буфера для лизиса NucliSens**.

ВНИМАНИЕ! При работе с материалом, содержащем сгустки, лизис рекомендуется проводить в пробирках объемом 1,5 мл. После окончания инкубации (см. п. 8) следует провести центрифугирование пробирок при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в специализированные пробирки, предназначенные для выделения ДНК/РНК в приборе NucliSENS easyMAG.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

6. В пробирки с **раствором для лизиса и ВКО STI-87**, внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром и тщательно перемешать пипетированием. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц.)
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.
8. Инкубировать пробирки в течение 10 мин при комнатной температуре.
9. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
10. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции ДНК с лизисом образцов вне прибора (*off board*).
11. После окончания экстракции ДНК, извлечь пробирки из прибора. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

При необходимости хранения очищенную ДНК следует перенести в стерильные пробирки не позднее 30 мин после выделения. Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С, любого срока хранения при температуре не выше минус 68 °С.

Вариант 2. Экстракция ДНК с лизисом образца в приборе

Порядок работы

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для экстракции ДНК/РНК (установить *Other*), объем образца (*Volume*) – **0,1 ml**, объем элюции (*Eluate*) – **25 µl**, тип образца (*Type*) – *Primary*, очередность экстракции ДНК в образцах (*priority*) – *Normal*.
3. Создать новый протокол выделения ДНК и сохранить его. В

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в приборе: ***On-board Lysis Buffer Dispensing – Yes, On-board Lysis Incubation – Yes.***

4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок, предназначенных для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая отрицательный контроль выделения). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-87**.
6. В пробирки с **ВКО** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц).
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.
8. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции ДНК с лизисом образцов в приборе (***on board***).
9. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении ***Instrument State – Idle***.
10. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Открыть крышку прибора, в каждую пробирку внести отдельным наконечником с фильтром по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
11. Закрыть крышку прибора и продолжить программу экстракции ДНК.
12. После окончания экстракции ДНК, извлечь пробирки из прибора. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

При необходимости хранения очищенную ДНК следует перенести в стерильные пробирки не позднее 30 мин после выделения. Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С, более длительно при температуре не выше минус 68 °С.

ТАБЛИЦА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Таблица приготовления реакционных смесей

Расчетная таблица приготовления реакционных смесей для проведения амплификации для комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

| Объем реагента на одну реакцию (мкл) | Объем реактивов на указанное количество реакций | | |
|--------------------------------------|---|----------------------|------------------------|
| | 10,00 | 5,00 | 0,50 |
| Число реакций ⁸ | ПЦР-смесь-1-FL-F, мкл | ПЦР-смесь-2-FRT, мкл | Полимераза (TaqF), мкл |
| 6 | 60 | 30 | 3,0 |
| 8 | 80 | 40 | 4,0 |
| 10 | 100 | 50 | 5,0 |
| 12 | 120 | 60 | 6,0 |
| 14 | 140 | 70 | 7,0 |
| 16 | 160 | 80 | 8,0 |
| 18 | 180 | 90 | 9,0 |
| 20 | 200 | 100 | 10,0 |
| 22 | 220 | 110 | 11,0 |
| 24 | 240 | 120 | 12,0 |
| 26 | 260 | 130 | 13,0 |
| 28 | 280 | 140 | 14,0 |
| 30 | 300 | 150 | 15,0 |
| 32 | 320 | 160 | 16,0 |

⁸ Число исследуемых образцов, включая контроль этапа экстракции ДНК (N), контроли этапа ПЦР, с запасом на один образец (N+3+1).

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

| | | | |
|---|-------------------------------------|---|--|
|  | Номер в каталоге |  | Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации |
|  | Код партии |  | Максимальное число тестов |
|  | Изделие для in vitro диагностики |  | Использовать до |
|  | Дата изменения |  | Обратитесь к руководству по эксплуатации |
|  | Ограничение температуры |  | Не допускать попадания солнечного света |
|  | Верхнее ограничение температуры |  | Дата изготовления |
|  | Производитель | | |



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 26 февраля 2019 года № ФСР 2012/13304

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® *Bordetella multi-FL*" по ТУ 9398-193-01897593-2012

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиревская, д. 3А

Производитель

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиревская, д. 3А

Место производства медицинского изделия

см. приложение

Номер регистрационного досье № РД-25790/6432 от 08.02.2019

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 26

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности 21.20.23.110

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 26 февраля 2019 года № 1411
допущено к обращению на территории Российской Федерации

**Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения**



Д.Ю. Павлюков

0042437

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 26 февраля 2019 года № ФСР 2012/13304

Лист 1

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® *Bordetella multi-FL*" по ТУ 9398-193-01897593-2012:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 4 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 5 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

Форма 6 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 7 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.

**Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения**



Д.Ю. Павлюков

0053806



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 27 февраля 2019 года № ФСР 2011/12380

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления ДНК *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® *N. meningitidis/H. influenzae/S. pneumoniae*-FL" по ТУ 9398-163-01897593-2010

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Производитель

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Место производства медицинского изделия

см. приложение

Номер регистрационного досье № РД-25877/8153 от 13.02.2019

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 26

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности 21.20.23.110

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 27 февраля 2019 года № 1465
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

**Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения**

Д.Ю. Павлюков

0042500

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 27 февраля 2019 года № ФСР 2011/12380

Лист 1

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления ДНК *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® *N. meningitidis/H. influenzae/S. pneumoniae*-FL" по ТУ 9398-163-01897593-2010:

Вариант FEP/FRT.

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F.

Форма 2 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Место производства:


1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.



Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения

Д.Ю. Павлюков
0054015

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 26.11.2011г. № 7226-17п/11

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека

В.И.Покровский
«28» 11 2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus
influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
**«АмплиСенс[®] *N.meningitidis* / *H.influenzae* /
S.pneumoniae-FL»**

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 3 |
| НАЗНАЧЕНИЕ | 3 |
| ПРИНЦИП МЕТОДА | 3 |
| ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ | 4 |
| АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ..... | 4 |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ | 5 |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ..... | 6 |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..... | 8 |
| ВАРИАНТ FEP..... | 9 |
| СОСТАВ | 9 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 9 |
| ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ..... | 10 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ | 10 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации | 10 |
| Б. Проведение амплификации..... | 12 |
| ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» | 13 |
| ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 14 |
| ВАРИАНТ FRT..... | 18 |
| СОСТАВ | 18 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 18 |
| ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ..... | 19 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»..... | 19 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации | 19 |
| Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» | 20 |
| АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 21 |
| СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ..... | 25 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией по «конечной точке» | 26 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» | 27 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

| | |
|--------------------------------|---|
| ВКО-FL | - внутренний контрольный образец для наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией |
| ОКО | - отрицательный контрольный образец |
| ПКО | - положительный контрольный образец |
| ПЦР | - полимеразная цепная реакция |
| ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора | - федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека |
| FEP | - детекция по «конечной точке» |
| FRT | - детекция в режиме «реального времени» |

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *N.meningitidis* / *H.influenzae* / *S.pneumoniae*-FL» предназначен для выявления ДНК *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* в образцах спинномозговой жидкости методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на одновременной амплификации участков ДНК *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae*, а также участка внутреннего контрольного образца (ВКО) в двух реакционных пробирках (формат «мультиплекс-ПЦР») и гибридационно-флуоресцентной детекции, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (вариант FRT), либо после ее завершения (вариант FEP). Реакционная смесь содержит олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые гибридационные зонды, которые комплементарны внутренним специфическим участкам амплифицируемого фрагмента. Флуоресцентный сигнал, испускаемый флуоресцентно-меченым зондом, детектируется оптическим блоком амплификатора непосредственно в процессе реакции в реальном времени (формат FRT) или флуоресцентным

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/EC

детектором по окончании амплификации (формат FEP). Флуоресцентно-меченые зонды для каждой из мишеней имеют свою длину волны, что позволяет регистрировать сигнал по соответствующему каналу. Для детекции трех возбудителей и ВКО используется амплификатор или флуоресцентный детектор с оптическим блоком, имеющим 2 и более каналов.

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 варианте.

Вариант FEP/FRT

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации:

Форма 1 включает «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения одновременной амплификации участков ДНК *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» или по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции (выделения) ДНК из клинического материала, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

| Вид клинического материала | Комплект для выделения ДНК | Комплект для амплификации и детекции | Патоген | Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ² |
|----------------------------|----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|--|
| Спинномозговая жидкость | «РИБО-преп» | «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F | <i>Neisseria meningitidis</i> | 1x10 ³ |
| | | | <i>Haemophilus influenzae</i> | |
| | | | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | |

Аналитическая специфичность

Оценку специфичности набора реагентов «АмплиСенс® *N.meningitidis* / *H.influenzae* / *S.pneumoniae*-FL» проводили при исследовании следующих штаммов микроорганизмов: *Enterobacter aerogenes*; *Enterobacter cloacae*; *Enterococcus faecalis* (ГИСК 29212); *Escherichia coli* (NCTC 9001); *Escherichia*

² Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала

coli (ATCC 25922); *Haemophilus parainfluenzae*; *Haemophilus Haemolyticus*; *Klebsiella oxytoca*; *Klebsiella pneumoniae*; *Listeria monocytogenes*; *Moraxella catarrhalis*; *Neisseria cinerea*; *Neisseria elongate*; *Neisseria flavescens*; *Neisseria gonorrhoeae*; *Neisseria mucosa*; *Neisseria sicca*; *Neisseria subflava*; *Pantoea agglomerans*; *Proteus mirabilis*; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Salmonella enteritidis* (ГИСК 1137); *Salmonella typhi* (Central Public Health Laboratory (London) 5715); *Shigella flexneri* 2a (ГИСК 1270); *Shigella sonnei* (ГИСК 9090); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305); *Streptococcus pneumoniae*; *Streptococcus agalactiae*; *Streptococcus milleri*; *Streptococcus mitis*; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus pyogenes*; *Streptococcus salivarius*; *Streptococcus sanguis*; *Streptococcus suis*; *Streptococcus viridians*; *Yersinia enterocolitica*; *Yersinia pseudotuberculosis*. Также аналитическую специфичность оценивали при тестировании ДНК человека. Неспецифических реакций выявлено не было.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического 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».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

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

микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

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

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009), «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Комплекты реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» рекомендуется использовать при одновременном исследовании клинического образца на энтеровирусы.

2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.
3. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
4. Центрифуга/вортекс.
5. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
7. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).

8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.
10. Емкость для сброса наконечников.

При детекции по «конечной точке»:

11. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclер (Corbett Research, Австралия), МахуGene (Ахуген, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США) или аналогичные).
12. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР (с плоской крышкой, нестрипованные):
 - а) объемом 0,2 мл (например, Ахуген, США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,2 мл (Gradient Palm Cyclер, GeneAmp PCR System 2700, МахуGene и др.);
 - б) объемом 0,5 мл (например, Ахуген, США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,5 мл («Терцик» и др.).

При детекции в режиме «реального времени»:

14. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iQ5 (Bio-Rad, США), Мх3000Р (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
15. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
 - а) на 0,2 мл (с плоской крышкой, нестрипованные; например, Ахуген, США) для постановки в ротор на 36 пробирок – к приборам для ПЦР в режиме «реального времени» с детекцией через дно пробирки (например, Rotor-Gene).

- б) на 0,2 мл (с куполообразной крышкой; например, Ахуген, США) – к приборам для ПЦР в режиме «реального времени» с детекцией через крышку (например, iQ5, Mx3000P).

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Материалом для исследования служат образцы спинномозговой жидкости. Спинномозговую жидкость (ликвор) следует получать с помощью одноразовых игл, в одноразовые пластиковые сухие пробирки объемом 2,0 мл в количестве не менее 1,0 мл. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Условия хранения материала:

- при комнатной температуре – в течение 6 ч;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 сут;
- при температуре не выше минус 16 °С – в течение 1 мес;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

ВАРИАНТ FEP**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для одновременной амплификации фрагментов ДНК *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* с гибридационно-флуоресцентной детекцией – включает:

| Реактив | Описание | Объем (мл) | Кол-во |
|--|--------------------------------|-------------------|---------------|
| ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Neisseria meningitidis</i> / STI | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |
| ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Streptococcus pneumoniae</i> / <i>Haemophilus influenzae</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |
| ПЦР-смесь-2-FRT | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,3 | 2 пробирки |
| Полимераза (TaqF) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 2 пробирки |
| ДНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Neisseria meningitidis</i>-Flu | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Haemophilus influenzae</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ПКО STI-88 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| Минеральное масло для ПЦР | Бесцветная вязкая жидкость | 4,0 | 1 флакон |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

| Реактив | Описание | Объем (мл) | Кол-во |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------|---------------|
| ВКО-FL³ | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,0 | 1 пробирка |
| ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

³ В процессе экстракции ДНК внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО-FL.

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

В качестве отрицательного контроля выделения (ОК) используют реагент **ОКО**.

Комплекты реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» рекомендуется использовать при одновременном исследовании клинического образца на энтеровирусы.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы (TaqF-ДНК-полимераза), которая активируется при прогреве реакционной смеси при температуре 95 °С в течение 15 мин.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета необходимого числа реакций, включающего тестирование исследуемых и контрольных образцов, согласно расчетной таблице (см. приложение 1). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого или контрольного образца ДНК необходимо

проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительных контролей (К+), отрицательного контроля (К-) и двух пробирок «Фон» для каждого типа смеси). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

1. До начала работы все реагенты набора разморозить, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб и образцов «Фон».
3. Для приготовления реакционных смесей и смесей для образцов «Фон» необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать одну из **ПЦР-смесей-1 (ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI** или **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae*)** и **ПЦР-смесь-2-FRT** согласно приложению 1. Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
4. Приготовить 4 пробирки «Фон» (по две для каждого типа реакционной смеси). Для этого внести по **15 мкл** приготовленных смесей (без **полимеразы (TaqF)**) в две пробирки «Фон», добавить по **10 мкл ДНК-буфера**, перемешать пипетированием. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
5. В оставшиеся части реакционных смесей добавить **полимеразу (TaqF)** (во все смеси) в количестве, указанном в приложении 1. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемого в реакционную смесь фермента полимеразы (TaqF), указанное в приложении 1, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок «Фон» (с вычетом двух пробирок «Фон»).

6. Внести в оставшиеся пробирки по **15 мкл** готовых реакционных смесей. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
7. В пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл проб**

ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, выделенных с помощью комплектов реагентов «ДНК-сорб-В» и «РИБО-сорб», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

8. Поставить контрольные реакции:

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;
- б) **положительные контроли ПЦР (К⁺*N.meningitidis*, К⁺STI)** – для ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI внести в подготовленные пробирки по **10 мкл ПКО ДНК *Neisseria meningitidis*-Flu** и **ПКО STI-88**, соответственно;
- в) **положительные контроли ПЦР (К⁺*S.pneumoniae*, К⁺*H.influenzae*)** – для ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae* внести в пробирки по **10 мкл ПКО ДНК *Streptococcus pneumoniae*** и **ПКО ДНК *Haemophilus influenzae***, соответственно.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Б. Проведение амплификации

ВНИМАНИЕ! Амплификацию проводить сразу после соединения реакционной смеси, проб ДНК и контролей. Запуск реакции на приборе должен произойти не позже, чем через 10–15 мин с момента внесения проб в реакционную смесь.

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу амплификации (см. табл. 1).

**Программа амплификации ДНК
(при использовании детекции по «конечной точке»)**

| Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке): | | | | Амплификаторы с матричным регулированием температуры: | | | | | |
|---|-----------------|----------|---|---|----------|---|-----------------|----------|---------------|
| GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), «Терцик» («ДНК-Технология») | | | GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cyclер (Corbett Research) | | | Uno-2 (Biometra), MiniCycler, PTC-100 (MJ Research) | | | |
| Цикл | Температура, °С | Время | Кол-во циклов | Температура, °С | Время | Циклы | Температура, °С | Время | Кол-во циклов |
| 0 | 95 | пауза | | 95 | пауза | | 95 | пауза | |
| 1 | 95 | 15 мин | 1 | 95 | 15 мин | 1 | 95 | 15 мин | 1 |
| 2 | 95 | 10 с | 42 | 95 | 10 с | 42 | 95 | 1 мин | 42 |
| | 56 | 10 с | | 56 | 25 с | | 56 | 1 мин | |
| | 72 | 10 с | | 72 | 25 с | | 72 | 1 мин | |
| 3 | 72 | 1 мин | 1 | 72 | 1 мин | 1 | 72 | 1 мин | 1 |
| 4 | 10 | хранение | | 10 | хранение | | 10 | хранение | |

2. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам (см. табл. 2).

Таблица 2

Схема соответствия тестируемых патогенов и каналов для флуорофора

| Канал для флуорофора | ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Neisseria meningitidis</i> / STI | ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Streptococcus pneumoniae</i> / <i>Haemophilus influenzae</i> |
|----------------------|---|---|
| FAM ⁴ | ДНК ВКО-FL | ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| JOE ⁴ | ДНК <i>Neisseria meningitidis</i> | ДНК <i>Haemophilus influenzae</i> |

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш,

⁴ Название каналов детекции для соответствующего детектора см. в соответствующем разделе методических рекомендаций к набору реагентов.

прилагаемый к набору реагентов, а также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *N.meningitidis* / *H.Influenzae* / *S.pneumoniae*-FL», разработанные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора (см. табл. 3 и методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «АмплиСенс® *N.meningitidis* / *H.Influenzae* / *S.pneumoniae*-FL», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Если значение уровня флуоресценции для пробы находится между пороговыми значениями положительного и отрицательного результата, он расценивается как **невалидный** или **сомнительный** и требует повторения ПЦР-исследования соответствующего исследуемого образца.

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

| ПЦР-смесь-1 | Сигнал по каналу | | Результат |
|---|--|---|--|
| | FAM | JOE | |
| ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Neisseria meningitidis</i> / STI | Выше порогового значения положительного результата | Ниже порогового значения отрицательного результата | В пробе не выявлена ДНК <i>Neisseria meningitidis</i> |
| | Выше или Ниже порогового значения отрицательного результата | Выше порогового значения положительного результата | В пробе выявлена ДНК <i>Neisseria meningitidis</i> |
| | Ниже порогового значения отрицательного результата | Ниже порогового значения отрицательного результата | Результат невалидный - проба требует повторного выделения и тестирования |
| ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Streptococcus pneumoniae</i> / <i>Haemophilus influenzae</i> | Выше порогового значения положительного результата | Ниже порогового значения отрицательного результата | В пробе выявлена ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| | Ниже порогового значения отрицательного результата | Выше порогового значения положительного результата | В пробе выявлена ДНК <i>Haemophilus influenzae</i> |
| | Ниже порогового значения отрицательного результата | Ниже порогового значения отрицательного результата | В пробе не выявлены ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и <i>Haemophilus influenzae</i> ⁵ |

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК в соответствии с табл. 4.

⁵ При уровне флуоресценции выше порогового значения по каналу FAM на ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| ПЦР-смесь-1 | Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Сигнал по каналу | | Обозначение результата в программах некоторых детекторов |
|---|--------------------------|--------------------------------------|---|---|--|
| | | | FAM | JOE | |
| ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Neisseria meningitidis</i> / STI | OK | Экстракция ДНК | <u>Выше</u> порогового значения положительного результата | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | «-» или «OK» |
| | K- | ПЦР | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | «нд» |
| | K+ <i>N.meningitidis</i> | ПЦР | <u>Ниже</u> порогового значения положительного результата | <u>Выше</u> порогового значения положительного результата | «+» или «OK» |
| | K+STI | ПЦР | <u>Выше</u> порогового значения положительного результата | <u>Ниже</u> порогового значения положительного результата | «+» или «OK» |
| ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Streptococcus pneumoniae</i> / <i>Haemophilus influenzae</i> | OK | Экстракция ДНК | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | «нд» |
| | K- | ПЦР | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | «нд» |
| | K+ <i>S.pneumoniae</i> | ПЦР | <u>Выше</u> порогового значения положительного результата | <u>Ниже</u> порогового значения положительного результата | «+» или «OK» |
| | K+ <i>H.influenzae</i> | ПЦР | <u>Ниже</u> порогового значения положительного результата | <u>Выше</u> порогового значения положительного результата | «+» или «OK» |

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по каналам для флуорофоров JOE или FAM ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, у которых сигнал по каналам флуорофоров JOE или FAM был ниже порогового значения положительного результата на соответствующем типе ПЦР-смеси-1.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) (кроме ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI по каналу для флуорофора FAM) и/или отрицательного контроля амплификации (К-) (по всем каналам) сигнал выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК соответствующих патогенов, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВАРИАНТ FRT**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации ДНК *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* с гибридационно-флуоресцентной детекцией – **включает:**

| Реактив | Описание | Объем (мл) | Кол-во |
|--|--------------------------------|-------------------|---------------|
| ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Neisseria meningitidis</i> / STI | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |
| ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Streptococcus pneumoniae</i> / <i>Haemophilus influenzae</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |
| ПЦР-смесь-2-FRT | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,3 | 2 пробирки |
| Полимераза (TaqF) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 2 пробирки |
| ДНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Neisseria meningitidis</i>-Flu | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Haemophilus influenzae</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ПКО STI-88 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| Минеральное масло для ПЦР | Бесцветная вязкая жидкость | 4,0 | 1 флакон |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

| Реактив | Описание | Объем (мл) | Кол-во |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------|---------------|
| ВКО-FL⁶ | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,0 | 1 пробирка |
| ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.

⁶ В процессе экстракции внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО-FL.

- Проведение ПЦР-амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используется реагент **ОКО**.

Комплекты реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» рекомендуется использовать при одновременном исследовании клинического образца на энтеровирусы.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. приложение 2). Следует учитывать, что **для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительных контролей (К+) и отрицательного контроля (К-) для каждого типа смеси).** Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

1. До начала работы все реагенты набора разморозить,

тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для приготовления реакционных смесей необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать одну из **ПЦР-смесей-1 (ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI** или **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae*)**, **ПЦР-смесь-2-FRT** и **полимеразу (TaqF)** в количестве, указанном в приложении 2. Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
4. Внести в отобранные пробирки по **15 мкл** готовых реакционных смесей.
5. В подготовленные пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, выделенных с помощью комплектов реагентов «ДНК-сорб-В» и «РИБО-сорб», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

6. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;
 - б) **положительные контроли ПЦР (К⁺*N.meningitidis*, К⁺STI)** – для **ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI** внести в пробирки по **10 мкл ПКО ДНК *Neisseria meningitidis*-Flu** и **ПКО STI-88**, соответственно;
 - в) **положительные контроли ПЦР (К⁺*S.pneumoniae*, К⁺*H.influenzae*)** – для **ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae*** внести в пробирки по **10 мкл ПКО ДНК *Streptococcus pneumoniae*** и **ПКО ДНК *Haemophilus influenzae***, соответственно.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения

соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 5).

Таблица 5

**Программа амплификации
(при использовании детекции в режиме «реального
времени»)**

| Цикл | Приборы роторного типа ⁷ | | | Приборы планшетного типа ⁸ | | |
|------|-------------------------------------|----------------------------|---------------|---------------------------------------|--------|---------------|
| | Температура, °С | Время | Кол-во циклов | Температура, °С | Время | Кол-во циклов |
| 1 | 95 | 15 мин | 1 | 95 | 15 мин | 1 |
| 2 | 95 | 10 с | 45 | 95 | 10 с | 45 |
| | 56 | 20 с | | 56 | 25 с | |
| | | детекция флуоресц. сигнала | | | | |
| 72 | 10 с | 72 | 10 с | | | |

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM⁹ и JOE⁹ (при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- По окончании выполнения программы приступить к анализу и учету результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам для флуорофоров: FAM и JOE.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с

⁷ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q и рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁸ Например, iCycler iQ, iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96» и рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁹ Название каналов детекции для соответствующего детектора см. в соответствующем разделе методических рекомендаций к набору реагентов.

ВАРИАНТ FRT

установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов.

Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 6, методическими рекомендациями по применению набора реагентов для выявления ДНК *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «АмплиСенс® *N.meningitidis* / *H.influenzae* / *S.pneumoniae*-FL», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора и вкладышем, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 6

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

| ПЦР-смесь-1 | Значение порогового цикла, Ct | | Результат |
|---|--|-----------------------------------|---|
| | По каналу для флуорофора FAM | По каналу для флуорофора JOE | |
| ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Neisseria meningitidis</i> / STI | <u>Меньше</u> граничного значения | <u>Больше</u> граничного значения | В пробе не выявлена ДНК <i>Neisseria meningitidis</i> |
| | <u>Больше или меньше</u> граничного значения | <u>Меньше</u> граничного значения | В пробе выявлена ДНК <i>Neisseria meningitidis</i> |
| | <u>Больше</u> граничного значения | <u>Больше</u> граничного значения | Результат невалидный - проба требует повторного перевыделения и тестирования |
| ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> | <u>Меньше</u> граничного значения | <u>Больше</u> граничного значения | В пробе выявлена ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| | <u>Больше</u> граничного значения | <u>Меньше</u> граничного значения | В пробе выявлена ДНК <i>Haemophilus influenzae</i> |
| | <u>Больше</u> граничного значения | <u>Больше</u> граничного значения | В пробе не выявлены ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и <i>Haemophilus influenzae</i> ¹⁰ |

¹⁰ При значении порогового цикла меньше граничного по каналу FAM на ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 7).

Таблица 7

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| ПЦР-смесь-1 | Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Значение порогового цикла, <i>Ct</i> | |
|---|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| | | | по каналу для флуорофора FAM | по каналу для флуорофора JOE |
| ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Neisseria meningitidis</i> / STI | OK | Экстракция ДНК | <u>Меньше</u> граничного значения | <u>Больше</u> граничного значения |
| | K- | ПЦР | <u>Больше</u> граничного значения | <u>Больше</u> граничного значения |
| | K+ <i>N.meningitidis</i> | ПЦР | <u>Больше</u> граничного значения | <u>Меньше</u> граничного значения |
| | K+STI | ПЦР | <u>Меньше</u> граничного значения | <u>Больше</u> граничного значения |
| ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Streptococcus pneumoniae</i> / <i>Haemophilus influenzae</i> | OK | Экстракция ДНК | <u>Больше</u> граничного значения | <u>Больше</u> граничного значения |
| | K- | ПЦР | <u>Больше</u> граничного значения | <u>Больше</u> граничного значения |
| | K+ <i>S.pneumoniae</i> | ПЦР | <u>Меньше</u> граничного значения | <u>Больше</u> граничного значения |
| | K+ <i>H.influenzae</i> | ПЦР | <u>Больше</u> граничного значения | <u>Меньше</u> граничного значения |

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал по каналам для флуорофоров FAM или JOE больше граничного значения, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых сигнал по каналам для флуорофоров FAM или JOE был больше граничного значения на соответствующем типе ПЦР-смеси-1.

2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) (кроме ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI по каналу для флуорофора FAM) и/или отрицательного контроля этапа ПЦР (К-) (по всем каналам для флуорофоров) сигнал меньше граничного значения, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК соответствующих патогенов, начиная с этапа экстракции ДНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.


Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI, ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae*, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI, ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae* хранить в защищенном от света месте.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *N.meningitidis* / *H.influenzae* / *S.pneumoniae*-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)¹¹.

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

 Е.Н. Родионова

Главный врач
ФГУЗ «Центр гигиены и Эпидемиологии
в Ярославской области»

 Н.Л. Карпов


¹¹ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией по «конечной точке»

| Объем реагента на одну реакцию (мкл) | Объем реагентов на указанное количество реакций (мкл) | | |
|--------------------------------------|---|-----------------|-------------------|
| | 10,00 | 5,00 | 0,50 |
| Число реакций ¹² | ПЦР-смесь-1-FRT | ПЦР-смесь-2-FRT | Полимераза (TaqF) |
| 8 | 80 | 40 | 3,0 |
| 10 | 100 | 50 | 4,0 |
| 12 | 120 | 60 | 5,0 |
| 14 | 140 | 70 | 6,0 |
| 16 | 160 | 80 | 7,0 |
| 18 | 180 | 90 | 8,0 |
| 20 | 200 | 100 | 9,0 |
| 22 | 220 | 110 | 10,0 |
| 24 | 240 | 120 | 11,0 |
| 26 | 260 | 130 | 12,0 |
| 28 | 280 | 140 | 13,0 |
| 30 | 300 | 150 | 14,0 |
| 32 | 320 | 160 | 15,0 |
| 34 | 340 | 170 | 16,0 |

¹² Число клинических образцов, контроли этапа экстракции ДНК (N), контроли этапа ПЦР и пробирки «Фон» с запасом на один образец (N+5+1).

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»

| Объем реагента на одну реакцию (мкл) | Объем реагентов на указанное количество реакций (мкл) | | |
|--------------------------------------|---|-----------------|-------------------|
| | 10,00 | 5,00 | 0,50 |
| Число реакций ¹³ | ПЦР-смесь-1-FRT | ПЦР-смесь-2-FRT | Полимераза (TaqF) |
| 6 | 60 | 30 | 3,0 |
| 8 | 80 | 40 | 4,0 |
| 10 | 100 | 50 | 5,0 |
| 12 | 120 | 60 | 6,0 |
| 14 | 140 | 70 | 7,0 |
| 16 | 160 | 80 | 8,0 |
| 18 | 180 | 90 | 9,0 |
| 20 | 200 | 100 | 10,0 |
| 22 | 220 | 110 | 11,0 |
| 24 | 240 | 120 | 12,0 |
| 26 | 260 | 130 | 13,0 |
| 28 | 280 | 140 | 14,0 |
| 30 | 300 | 150 | 15,0 |
| 32 | 320 | 160 | 16,0 |

¹³ Число клинических образцов, контроли этапа экстракции ДНК (N), контроли этапа ПЦР с запасом на один образец (N+3+1).



July 2025

QIAamp[®] DNA Mini and Blood Mini Handbook

For DNA purification from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, dried blood spots (QIAamp DNA Mini Kit only), body fluids, cultured cells, swabs, and tissue (QIAamp DNA Mini Kit only)

Table of Contents

| | |
|---|----|
| Kit Contents | 4 |
| Storage | 6 |
| Intended Use | 7 |
| Safety Information | 8 |
| Quality Control | 9 |
| Introduction | 10 |
| Purification of viral RNA and DNA | 11 |
| Purification of DNA from urine | 11 |
| Purification of DNA from stool | 12 |
| Purification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues | 12 |
| Purification of DNA from forensic and human identity samples | 13 |
| Purification of high-molecular-weight DNA | 13 |
| Processing large sample volumes | 14 |
| High-throughput sample processing | 14 |
| Principle and procedure | 15 |
| Equipment and Reagents to Be Supplied by User | 21 |
| Important Notes | 23 |
| Preparation of reagents | 23 |
| Preparation of buffy coat | 26 |
| Handling of QIAamp Mini columns | 26 |
| Processing QIAamp Mini columns using a microcentrifuge (spin protocols) | 27 |
| Copurification of RNA | 34 |
| Elution mode for maximum yield or concentration | 35 |

| | |
|--|----|
| Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol) | 37 |
| Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Vacuum Protocol) | 42 |
| Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit) | 47 |
| Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol) | 53 |
| Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Vacuum Protocol) | 57 |
| Protocol: DNA Purification from Dried Blood Spots (QIAamp DNA Mini Kit) | 61 |
| Troubleshooting Guide | 64 |
| Appendix A: Determination of Concentration, Yield, Purity, and Length of DNA | 69 |
| Appendix B: Protocol for Cultured Cells | 71 |
| Appendix C: Protocols for Bacteria | 74 |
| Appendix D: Protocol for Yeast (e.g., Cultured <i>Candida</i> spp.) | 78 |
| Appendix E: Protocols for Viral DNA | 80 |
| Appendix F: Protocols for Eye, Nasal, or Pharyngeal Swabs | 84 |
| Appendix G: Protocol for Mitochondrial DNA from Platelets | 86 |
| Appendix H: Protocol for CSF and Bone Marrow on Hematological Slides | 88 |
| Appendix I: Protocol for Crude Cell Lysates and Other Samples | 90 |
| Appendix J: Protocol for Sample Concentration | 93 |
| Ordering Information | 94 |
| Document Revision History | 96 |

Kit Contents

| QIAamp DNA Kits Catalog no. Number of preps | Blood Mini (50) 51104 50 | Blood Mini (250) 51106 250 | Mini (50) 51304 50 | Mini (250) 51306 250 |
|--|---|---|-----------------------------------|-------------------------------------|
| QIAamp Mini Spin Columns | 50 | 250 | 50 | 250 |
| Collection Tubes (2 mL) | 150 | 750 | 150 | 750 |
| Buffer AL* | 12 mL | 2 x 33 mL | 12 mL | 2 x 33 mL |
| Buffer ATL | – | – | 14 mL | 50 mL |
| Buffer AW1* (concentrate) | 19 mL | 98 mL | 19 mL | 98 mL |
| Buffer AW2† (concentrate) | 13 mL | 66 mL | 13 mL | 66 mL |
| Buffer AE | 15 mL | 60 mL | 2 x 15 mL | 128 mL |
| QIAGEN® Protease | 1 vial‡ | 1 vial§ | – | – |
| Protease Solvent† | 1.2 mL | 5.5 mL | – | – |
| Proteinase K | – | – | 1.25mL | 6mL |
| Selection Guide | 1 | 1 | 1 | 1 |

*Contains chaotropic salt. Not compatible with disinfecting agents containing bleach; see page 8 for Safety Information.

† Contains sodium azide as a preservative.

‡ Resuspension volume 1.2 mL.

§ Resuspension volume 5.5 mL.

Ordering Information for separately available buffers and enzymes:

| Product | Contents | Cat. no. |
|-----------------------------|---|-----------------|
| Buffer AL (216 mL) | 216 mL Lysis Buffer AL | 19075 |
| Buffer ATL (200 mL) | 200 mL Tissue Lysis Buffer for 1000 preps | 19076 |
| Buffer AE (240 mL) | 240 mL Elution Buffer AE | 19077 |
| QIAGEN Protease (7.5 AU) | 7.5 Anson units per vial (lyophilized) | 19155 |
| QIAGEN Protease (30 AU) | 4 x 7.5 Anson units per vial (lyophilized) | 19157 |
| QIAGEN Proteinase K (2 mL) | 2 mL (>600 mAU/mL, solution) | 19131 |
| QIAGEN Proteinase K (10 mL) | 10 mL (>600 mAU/mL, solution) | 19133 |
| RNase A (17,500 U) | 2.5 mL (100 mg/mL; 7000 units/mL, solution) | 19101 |

Storage

QIAamp Mini spin columns and buffers can be stored dry at room temperature (15–25°C) for up to 1 year without showing any reduction in performance.

Lyophilized QIAGEN Protease can be stored at room temperature for up to 12 months without any decrease in performance. For storage longer than 12 months or if ambient temperatures constantly exceed 25°C, QIAGEN Protease should be stored dry at 2–8°C.

QIAGEN Protease reconstituted in Buffer AVE, Protease Solvent, and Protease Suspension buffer is stable for 12 months when stored at 2–8°C. Keeping the QIAGEN Protease stock solution at room temperature for prolonged periods of time should be avoided.

QIAamp DNA Mini Kits contain ready-to-use proteinase K solution, which is dissolved in a specially formulated storage buffer. The proteinase K is stable for up to 1 year after delivery when stored at room temperature. To prolong the lifetime of Proteinase K, storage at 2–8°C is recommended.

Intended Use

The QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit are intended for molecular biology applications. These products are not intended for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

All due care and attention should be exercised in the handling of the products. We recommend all users of QIAGEN products to adhere to the NIH guidelines that have been developed for recombinant DNA experiments, or to other applicable guidelines.

Safety Information

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, please consult the appropriate safety data sheets (SDSs). These are available online in convenient and compact PDF format at www.qiagen.com/safety where you can find, view, and print the SDS for each QIAGEN kit and kit components.

CAUTION

DO NOT add bleach or acidic solutions directly to the sample preparation waste.



The sample preparation waste contains guanidine hydrochloride from Buffers AL and AW1, which can form highly reactive compounds when combined with bleach.

If liquid containing these buffers is spilled, clean with suitable laboratory detergent and water. If the spilled liquid contains potentially infectious agents, clean the affected area first with laboratory detergent and water, and then with 1% (v/v) sodium hypochlorite.

Quality Control

In accordance with QIAGEN's ISO-certified Quality Management System, each lot of the QIAamp DNA Mini Kit and the QIAamp DNA Blood Mini Kit is tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

Introduction

QIAamp DNA Mini and QIAamp DNA Blood Mini Kits provide fast and easy methods for purification of total DNA for reliable PCR and Southern blotting. Total DNA (e.g., genomic, viral, mitochondrial) can be purified from whole blood, plasma, serum, buffy coat, bone marrow, other body fluids, lymphocytes, cultured cells, tissue, and forensic specimens.

The simple QIAamp spin and vacuum procedures, which are ideal for simultaneous processing of multiple samples, yield pure DNA ready for direct amplification in just 20 minutes. The QIAamp spin procedures can be fully automated on the QIAcube® for increased standardization and ease of use (see page 19). The QIAamp procedure is suitable for use with fresh or frozen whole blood and blood that has been treated with citrate, heparin, or EDTA. Prior separation of leukocytes is not necessary. Purification requires no phenol/chloroform extraction or alcohol precipitation, and involves very little handling. DNA is eluted in Buffer AE or water, ready for direct addition to PCR or other enzymatic reactions. Alternatively, it can be safely stored at -30°C to -15°C for later use. The purified DNA is free of protein, nucleases, and other contaminants or inhibitors.

DNA purified using QIAamp Kits is up to 50 kb in size, with fragments of approximately 20–30 kb predominating. DNA of this length denatures completely during thermal cycling and can be amplified with high efficiency.

For purification of genomic DNA from blood for in vitro diagnostics in Europe, the QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (cat. no. 61104) is CE-IVD marked according to the Regulation (EU) 2017/746.

Purification of viral RNA and DNA

For purification of viral RNA, the QIAamp Viral RNA Mini Kit (cat. no. 52904) is recommended. All buffers and components are guaranteed to be RNase free. Alternatively, for simultaneous purification of viral DNA and RNA, we recommend using the QIAamp MinElute® Virus Vacuum Kit (cat. no. 577144) or the QIAamp MinElute Virus Spin Kit (cat. no. 57704). These kits provide viral nucleic acid purification with minimal elution volumes for higher sensitivity in downstream applications. All buffers and components of these kits are guaranteed to be RNase free. Viral nucleic acid purification using the QIAamp MinElute Virus Spin Kit or the QIAamp Viral RNA Mini Kit can be fully automated on the QIAcube Connect for increased standardization and ease of use.

Purification of viral DNA is possible with QIAamp DNA Mini or QIAamp DNA Blood Mini Kits. Because cellular DNA copurifies with viral DNA, cell-free samples (e.g., plasma, serum) are necessary to obtain pure viral DNA. For preparation of DNA from free viral particles in fluids or suspensions (other than urine) using the blood and body fluid protocols, see Appendix F, page 80.

For purification of viral nucleic acids for in vitro diagnostics in Europe, the QIAamp DSP Virus Kit is CE-IVD marked according to the Regulation (EU) 2017/746.

Purification of DNA from urine

For preparation of cellular, bacterial, or viral DNA from urine, the QIAamp Viral RNA Mini Kit (cat. no. 52904) is recommended. Buffer AVL supplied with this kit is optimized to inactivate the numerous PCR inhibitors found in urine.

Purification of DNA from stool

The QIAamp DNA Fast Stool Mini Kit (cat. no. 51604) is recommended for preparation of DNA from stool. Stool samples typically contain many compounds that can degrade DNA and inhibit downstream enzymatic reactions. The QIAamp DNA Fast Stool Mini Kit removes these substances through the action of a proprietary reagent that efficiently adsorbs inhibitors, together with a lysis buffer that provides optimized conditions for inhibitor removal. DNA purification using the QIAamp DNA Fast Stool Mini Kit can be fully automated on the QIAcube Connect for increased standardization and ease of use.

QIAamp DNA Mini or QIAamp DNA Blood Mini Kits can also be used to purify viral DNA from stool, but removal of inhibitors is not as effective. See Appendix F, page 80.

Purification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues

The QIAamp DNA FFPE Advanced (cat.no. 56604) and QIAamp DNA FFPE Advanced UNG Kits (cat. no. 56704) are recommended for purification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues. The procedure consists of a simplified deparaffinization step, two lysis steps with in-between de-crosslinking and optional artifact removal (QIAamp DNA FFPE Advanced UNG Kit), and the established bind–wash–elute steps.

Purification of DNA from forensic and human identity samples

The QIAamp DNA Investigator Kit (cat. no. 56504) is recommended for purification of total (genomic and mitochondrial) DNA from a wide range of forensic and human identity samples, such as casework or crime-scene samples, dried blood, bone, and sexual assault samples, swabs, and filters. Purification is fast and efficient, and purified DNA performs well in downstream analyses, such as quantitative PCR and STR analysis, with high signal-to-noise ratios. The procedure is designed to ensure that there is no sample-to-sample cross-contamination. Purification of DNA using the QIAamp DNA Investigator Kit can be automated on the QIAcube.

Purification of high-molecular-weight DNA

To purify high-molecular-weight DNA, larger than 50 kb, we recommend using MagAttract HMW DNA Kit (cat. no. 67563), QIAGEN Genomic-Tips (cat. nos. 10223, 10243, and 10262), or Puregene® Kits (www.qiagen.com/Puregene-Kits).

The MagAttract HMW DNA Kit enables purification of high-molecular-weight DNA using a simple, magnetic bead-based protocol.

QIAGEN Genomic-Tips are gravity-flow, anion-exchange tips that enable purification of DNA of up to 150 kb from a wide range of sample types. The tips are available separately or, with QIAGEN Protease and buffers, as part of Blood & Cell Culture DNA Kits (cat. nos. 13323, 13343, and 13362).

Puregene Kits use a modified salting-out precipitation method for purification of archive-quality DNA of 100–200 kb. The procedure is scalable for large or small sample volumes, and kits are available for a wide range of sample types. An ongoing study of archived DNA has shown that purified DNA can be stored for at least 14 years without degradation.

Processing large sample volumes

QIAamp DNA Blood Midi and Maxi Kits (cat. nos. 51183 and 51192) are available for purification of DNA from up to 2 and 10 mL of blood, respectively. The QIAamp 96 DNA Blood Kit (cat. no. 51161) provides purification capabilities in a 96-well format for up to 200 μ L samples sizes. These kits use the same silica-membrane technology as the QIAamp DNA Blood Mini Kit.

The FlexiGene[®] DNA Kit (cat. no. 51206) provides scalable purification of genomic DNA from whole blood, buffy coat, or cultured cells in a single tube. The simple, rapid procedure yields pure DNA of up to 150 kb, ready to use in downstream applications such as PCR or Southern blotting.

Puregene Kits provide a scalable procedure for large or small sample volumes. The kits use a modified salting-out precipitation method for purification of archive-quality DNA and kits are available for a wide range of sample types.

High-throughput sample processing

Please contact one of the QIAGEN Technical Service Departments (see the back cover), or visit www.qiagen.com for detailed information on high-throughput QIAamp systems and automated solutions.

Principle and procedure

QIAamp DNA Mini and QIAamp DNA Blood Mini Kits are designed for rapid purification of an average of 6 µg of total DNA (e.g., genomic, viral, mitochondrial) from 200 µL of whole human blood and up to 50 µg of DNA from 200 µL of buffy coat, 5×10^6 lymphocytes, or cultured cells that have a normal set of chromosomes. The procedure is suitable for use with whole blood treated with citrate, heparin, or EDTA;* buffy coat; lymphocytes; plasma; serum; and body fluids. Samples may be either fresh or frozen. For larger volumes of whole blood or cultured cells, we recommend using QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits.

The QIAamp DNA Mini Kit performs all the functions of the QIAamp DNA Blood Mini Kit, and also allows rapid purification of DNA from solid tissue. On average, up to 30 µg of DNA can be purified from 25 mg of various human tissues.

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

Lysis with QIAGEN Protease or Proteinase K

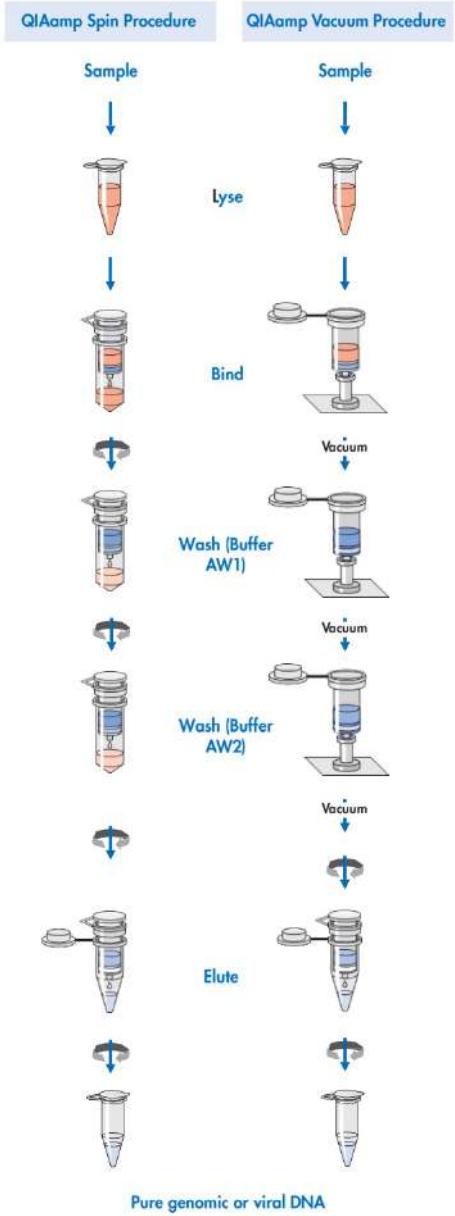
QIAamp DNA Blood Mini Kits contain QIAGEN Protease. Intensive research has shown that QIAGEN Protease is the optimal enzyme for use with the lysis buffer provided in the QIAamp DNA Blood Mini Kit. QIAGEN Protease is completely free of DNase and RNase activity.

When using the QIAamp DNA Blood Mini Kit for a sample that requires a modified protocol, please contact our Technical Service Department for advice about whether your lysis conditions are compatible with QIAGEN Protease. When >8 mM EDTA is used in conjunction with $>0.5\%$ SDS,* QIAGEN Protease activity decreases. For samples that require an SDS-containing lysis buffer or that contain high levels of EDTA, the QIAamp DNA Mini Kit is recommended. The QIAamp DNA Mini Kit contains proteinase K, which is the enzyme of choice for SDS-containing lysis buffers used in the tissue protocol, but which performs equally well in the blood and body fluid protocol. The activity of the proteinase K solution is 600 mAU/mL solution (or 40 mAU/mg protein). This activity provides optimal results in QIAamp protocols.

Purification on QIAamp Mini spin columns

The QIAamp DNA purification procedure comprises 4 steps and is carried out using QIAamp Mini spin columns in a standard microcentrifuge, on a vacuum manifold, or fully automated on the QIAcube (see page 19). The procedures are designed to ensure that there is no sample-to-sample cross-contamination and allow safe handling of potentially infectious samples.

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.



QIAamp Mini spin columns fit into most standard microcentrifuge tubes. In the spin protocol, due to the volume of filtrate, 2 mL collection tubes (provided) are required to support the QIAamp Mini spin column during loading and wash steps. For the vacuum protocol, a vacuum manifold (e.g., QIAvac 24 Plus manifold; and a vacuum pump capable of producing a vacuum of -800 to -900 mbar are required. Eluted DNA can be collected in standard 1.5 mL microcentrifuge tubes (not provided).

Adsorption to the QIAamp membrane

The lysate buffering conditions are adjusted to allow optimal binding of the DNA to the QIAamp membrane before the sample is loaded onto the QIAamp Mini spin column. DNA is adsorbed onto the QIAamp silica membrane during a brief centrifugation or vacuum step. Salt and pH conditions in the lysate ensure that protein and other contaminants, which can inhibit PCR and other downstream enzymatic reactions, are not retained on the QIAamp membrane. If the initial sample volume is larger than 200 μL , it will be necessary to load the lysate onto the QIAamp Mini spin column in several steps. If larger sample volumes are required, we suggest using QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits (Midi: 1–2 mL; Maxi: 5–10 mL starting material).

Removal of residual contaminants

DNA bound to the QIAamp membrane is washed in two centrifugation or vacuum steps. The use of two different wash buffers, Buffer AW1 and Buffer AW2, significantly improves the purity of the eluted DNA. Wash conditions ensure complete removal of any residual contaminants without affecting DNA binding.

Elution of pure nucleic acids

Purified DNA is eluted from the QIAamp Mini spin column in a concentrated form in either Buffer AE or water. Elution buffer should be equilibrated to room temperature (15–25°C) before it is applied to the column. Yields will be increased if the QIAamp Mini spin column is incubated with the elution buffer at room temperature for 5 minutes before centrifugation. The eluted genomic DNA is up to 50 kb in length (predominantly 20–30 kb) and is suitable for direct use in PCR or Southern blotting applications.

If the purified DNA is to be stored, elution in Buffer AE (10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0) and storage at –30°C to –15°C is recommended. If high pH or EDTA affects sensitive downstream applications, use water for elution. However, ensure that the pH of the water is at least 7.0 (deionized water from certain sources can be acidic). DNA stored in water is subject to degradation by acid hydrolysis.

Automated DNA purification on the QIAcube

Purification of DNA from blood, body fluids, tissues, and bacteria using the QIAamp DNA Mini Kit or the QIAamp DNA Blood Mini Kit can be fully automated on the QIAcube Connect (cat. no. 9002864) or the classic QIAcube. The innovative QIAcube instruments use advanced technology to process QIAGEN spin columns, enabling seamless integration of automated, low-throughput sample prep into your laboratory workflow. Sample preparation using the QIAcube instruments follows the same steps as the manual procedure (i.e., lyse, bind, wash, and elute), enabling you to continue using the QIAamp DNA Mini Kit and the QIAamp DNA Blood Mini Kit for purification of high-quality DNA.

The dedicated QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit (cat. no. 51126) enables automated DNA isolation from blood and DNA isolation from body fluids on the QIAcube Connect. The kit includes rotor adapters that are preloaded with QIAamp spin columns and elution tubes, delivering greater convenience and time savings. Furthermore, ease of use is increased and user errors are minimized. Waste is reduced, because the content of the dedicated kit is

tailored for purification on the QIAcube Connect and the superfluous tubes that are required for the manual procedure are not included.

QIAcube instruments are preinstalled with protocols for purification of plasmid DNA, genomic DNA, RNA, viral nucleic acids and proteins, plus DNA and RNA cleanup. The range of protocols available is continually expanding, and additional QIAGEN protocols can be downloaded free of charge at www.qiagen.com/qiacubeprotocols.



Figure 1. Automated DNA purification. DNA purification using the QIAamp DNA Mini Kit or the QIAamp DNA Blood Mini Kit can be fully automated on the QIAcube.

Equipment and Reagents to Be Supplied by User

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

- Ethanol (96–100%)*
- 1.5 mL microcentrifuge tubes
- Pipet tips with aerosol barrier
- Microcentrifuge (with rotor for 2 mL tubes)
- Vortexer
- Water bath or heating block at 56°C
- Phosphate-buffered saline (PBS) may be required for some samples

For vacuum protocols

- QIAvac 24 Plus (cat. no. 19413) or equivalent
- VacConnectors (cat. no. 19407)
- Vacuum Regulator (cat. 19530) for easy monitoring of vacuum pressures and easy releasing of vacuum
- Vacuum Pump (cat. no. 84010 [USA and Canada], 84000 [Japan], or 84020 [rest of world]) or equivalent pump capable of producing a vacuum of –800 to –900 mbar
- **For buccal swabs or large volumes:** Extension Tubes (cat. no. 15987)
- **Optional:** VacValves (cat. no. 19408)

*Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone.

- **Optional:** QIAvac Connecting System (cat. no. 19419)
- **Optional:** RNase A (100 mg/mL)

For tissues

- Additional water bath or heating block at 70°C
- **Optional:** Equipment for mechanical disruption, such as the TissueRuptor® or mortar and pestle, and liquid nitrogen

For buccal swabs

- Additional Buffer AL (cat. no. 19075)
- 2 mL microcentrifuge tubes
- For cotton or DACRON® swabs: Scissors or appropriate cutting device

For dried blood spots

- 3 mm single-hole paper puncher
- Two additional water baths or heating blocks at 85°C and 70°C

Important Notes

Preparation of reagents

QIAGEN Protease stock solution (store at 2–8°C)

When using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (50), pipet 1.2 mL protease solvent into the vial containing lyophilized QIAGEN Protease, as indicated on the label. When using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (250), pipet 5.5 mL protease solvent into the vial containing lyophilized QIAGEN Protease, as indicated on the label.

Dissolved QIAGEN Protease is stable for up to 12 months when stored at 2–8°C.

Note: If you also use QIAamp MinElute Virus Kits, be aware that the QIAGEN Protease supplied with these kits is reconstituted in protease resuspension buffer or Buffer AVE and is not compatible with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. After reconstituting a vial of QIAGEN Protease, label the resuspended QIAGEN Protease to indicate which buffer was used for resuspension.

Buffer AL* (store at room temperature, 15–25°C)

Mix Buffer AL thoroughly by shaking before use. Buffer AL is stable for 1 year when stored at room temperature.

Note: Do not add QIAGEN Protease or Proteinase K directly to Buffer AL.

* This contains chaotropic salt.

Buffer AW1* (store at room temperature, 15–25°C)

Buffer AW1 is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle.

Buffer AW1 is stable for 1 year when stored closed at room temperature.

Buffer AW2† (store at room temperature, 15–25°C)

Buffer AW2 is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) to Buffer AW2 concentrate as indicated on the bottle.

Buffer AW2 is stable for 1 year when stored closed at room temperature.

Carrier DNA

Use carrier DNA (e.g., poly dA, poly dT, poly dA:dT) when the sample is low copy (i.e., when <10,000 copies are present). For preparation of DNA from free viral particles in fluids or suspensions (other than urine) using the blood and body fluid protocols, we recommend the addition of 1 µL of an aqueous solution containing 5–10 µg of carrier DNA (e.g., poly dA, poly dT, poly dA:dT) to 200 µL Buffer AL. To ensure binding conditions are optimal, increase the volume of ethanol added at step 6 from 200 to 230 µL. Elution should be in 60 µL Buffer AE.

* This contains chaotropic salt.

† This contains sodium azide as preservative.

Amounts of starting material

Use the amounts of starting material indicated in Table 1.

Table 1. Amounts of starting material for QIAamp Mini Procedures

| Sample | Amount |
|----------------------|-----------------------|
| Blood, plasma, serum | 200 μ L |
| Buffy | 200 μ L |
| Tissue | 25 mg* |
| Cells (diploid) | 5×10^6 cells |

*When isolating DNA from spleen, 10 mg samples should be used.

Small samples should be adjusted to 200 μ L with PBS before loading. For samples larger than 200 μ L, the amount of lysis buffer and other reagents added to the sample before loading must be increased proportionally (see note below). Application of the lysed sample to the QIAamp Mini spin column will require more than one loading step if the initial sample volume is increased. The amounts of Buffer AW1 and Buffer AW2 used in the wash steps do not need to be increased.

Scaling up the tissue protocol is possible in principle. The volumes of Buffer ATL and proteinase K used should be increased proportionally, while the volumes of wash and elution buffers should remain constant. The user should determine the maximum amount of tissue used. It is important not to overload the column, as this can lead to significantly lower yields than expected.

Note: All QIAamp buffers can be purchased separately to supplement the QIAamp DNA Mini and QIAamp DNA Blood Mini Kits. QIAGEN Proteinase K is recommended for use with tissue samples. QIAGEN Protease is suitable for genomic DNA preparation from blood, cells, and body fluids.

Preparation of buffy coat

Buffy coat is a leukocyte-enriched fraction of whole blood. Preparing a buffy coat fraction from whole blood is simple and yields approximately 5–10 times more DNA than an equivalent volume of whole blood.

Prepare buffy coat by centrifuging whole blood at $2500 \times g$ for 10 minutes at room temperature (15–25°C). After centrifugation, three different fractions are distinguishable: the upper clear layer is plasma; the intermediate layer is buffy coat, containing concentrated leukocytes; and the bottom layer contains concentrated erythrocytes.

Handling of QIAamp Mini columns

Because of the sensitivity of nucleic acid amplification technologies, the following precautions are necessary when handling QIAamp Mini columns to avoid cross-contamination between sample preparations:

- Carefully apply the sample or solution to the QIAamp Mini column. Pipet the sample into the QIAamp Mini column without wetting the rim of the column.
- Change pipette tips between all liquid transfers. The use of aerosol-barrier pipette tips is recommended.
- Avoid touching the QIAamp membrane with the pipette tip.
- After all pulse-vortexing steps, briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tubes to remove drops from the inside of the lid.
- Wear gloves throughout the entire procedure. In case of contact between gloves and sample, change gloves immediately.

Centrifugation

QIAamp Mini columns will fit into most standard 1.5–2 mL microcentrifuge tubes. Additional 2 mL collection tubes are available separately.

Centrifugation of QIAamp Mini columns is performed at 6000 x g (8000 rpm) to reduce centrifuge noise. Centrifuging QIAamp Mini columns at full speed will not affect DNA yield. Centrifugation at lower speeds is also acceptable, provided that nearly all of each solution is transferred through the QIAamp membrane. When preparing DNA from buffy coat or lymphocytes, full-speed centrifugation is recommended to avoid clogging.

All centrifugation steps should be carried out at room temperature (15–25°C).

Processing QIAamp Mini columns using a microcentrifuge (spin protocols)

Close the QIAamp Mini column before placing it in the microcentrifuge. Centrifuge as described.

- Remove the QIAamp Mini column and collection tube from the microcentrifuge. Place the QIAamp Mini column in a new collection tube. Discard the filtrate and the collection tube.
Note: The filtrate may contain hazardous waste and should be disposed of appropriately.
- Open only one QIAamp Mini column at a time, and take care to avoid generating aerosols.
- For efficient parallel processing of multiple samples, fill a rack with collection tubes to which the QIAamp Mini columns can be transferred after centrifugation. Used collection tubes containing the filtrate can be discarded, and the new collection tubes containing the QIAamp Mini columns can be placed directly in the microcentrifuge.

The QIAvac 24 Plus

The QIAvac 24 Plus is designed for fast and efficient vacuum processing of up to 24 QIAGEN spin columns in parallel. Samples and wash solutions are drawn through the column membranes by vacuum instead of centrifugation, providing greater speed and reduced hands-on time in purification procedures.

In combination with the QIAvac Connecting System (optional), the QIAvac 24 Plus can be used as a flow-through system. The sample flow through is collected in a separate waste bottle.

For maintenance of the QIAvac 24 Plus, please refer to the handling guidelines in the *QIAvac 24 Plus Handbook*.

Processing QIAamp Mini Columns on the QIAvac 24 Plus (vacuum protocols)

QIAamp Mini spin columns are processed on the QIAvac 24 Plus using disposable VacConnectors and reusable VacValves. VacValves (optional) are inserted directly into the luer slots of the QIAvac 24 Plus manifold and ensure a steady flow rate, facilitating parallel processing of samples of different natures (e.g., blood and body fluids), volumes, or viscosities. They should be used if sample flow rates differ significantly to ensure consistent vacuum. VacConnectors are disposable connectors that fit between QIAamp Mini columns and VacValves or between the QIAamp Mini columns and the luer slots of the QIAvac 24 Plus. They prevent direct contact between the spin column and VacValve during purification, avoiding any cross-contamination between samples. VacConnectors are discarded after a single use.

Handling guidelines for the QIAvac 24 Plus

- Always place the QIAvac 24 Plus on a secure bench top or work area. If dropped, the QIAvac 24 Plus manifold may crack.
- Always store the QIAvac 24 Plus clean and dry. For cleaning procedures, see the *QIAvac 24 Plus Handbook*.
- The components of the QIAvac 24 Plus are not resistant to certain solvents (Table 2). If these solvents are spilled on the unit, rinse it thoroughly with water.
- To ensure consistent performance, do not apply silicone or vacuum grease to any part of the QIAvac 24 Plus manifold.
- Always use caution and wear safety glasses when working near a vacuum manifold under pressure.
- Contact QIAGEN Technical Services or your local distributor for information concerning spare or replacement parts.
- The vacuum pressure is the pressure differential between the inside of the vacuum manifold and the atmosphere (standard atmospheric pressure 1013 millibar or 760 mm Hg) and can be measured using the QIAvac Connecting System or a vacuum regulator (see Figure 3). The vacuum protocol requires a vacuum pump capable of producing a vacuum of -800 to -900 mbar (e.g., QIAGEN, Vacuum Pump). Higher vacuum pressures must be avoided. Use of vacuum pressures lower than recommended may reduce DNA yield and purity and increase the frequency of clogged membranes.

Table 2. Chemical resistance properties of QIAvac 24 Plus

Resistant to

| | | |
|--------------|-----------------------|-------------------|
| Acetic acid | Chaotropic salts | Chlorine bleach |
| Chromic acid | Concentrated alcohols | Hydrochloric acid |
| SDS | Sodium chloride | Sodium hydroxide |
| Tween® 20 | Urea | |

Not Resistant to:

| | | |
|---------|------------|--------|
| Benzene | Chloroform | Ethers |
| Phenol | Toulene | |



Figure 2. Schematic diagram of the Vacuum Regulator.

Setup of the QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Connect the QIAvac 24 Plus to a vacuum source. If using the QIAvac Connecting System, connect the system to the manifold and vacuum source as described in Appendix A of the *QIAvac 24 Plus Handbook*.

2. Insert a VacValve into each luer slot of the QIAvac 24 Plus that is to be used (see Figure 3). Close unused luer slots with luer plugs or close the inserted VacValve.

VacValves should be used if flow rates of samples differ significantly to ensure consistent vacuum.

3. Insert a VacConnector into each VacValve (see Figure 3).

Perform this step directly before starting the purification to avoid exposure of VacConnectors to potential contaminants in the air.

4. Place the QIAamp Mini columns into the VacConnectors on the manifold (see Figure 3).

5. If necessary, insert an Extension Tube into each QIAamp Mini column (see Figure 4).

Extension Tubes are required for processing buccal swabs or large volumes.

6. For nucleic acid purification, follow the instructions in the vacuum protocols. Discard the VacConnectors appropriately after use.

Leave the lid of the QIAamp Mini column open while applying vacuum.

Switch off the vacuum between steps to ensure that a consistent, even vacuum is applied during processing. For faster vacuum release, a vacuum regulator should be used (see Figure 3).

Note: Each VacValve can be closed individually when the sample is completely drawn through the spin column, allowing parallel processing of samples of different volumes or viscosities.

7. After processing samples, clean the QIAvac 24 Plus (see “Cleaning and Decontaminating the QIAvac 24 Plus” in the *QIAvac 24 Plus Handbook*).

Note: Buffers AL and AW1 used in QIAamp DNA Mini and QIAamp DNA Blood Mini procedures are not compatible with disinfecting agents containing bleach. See page 6 for safety information.

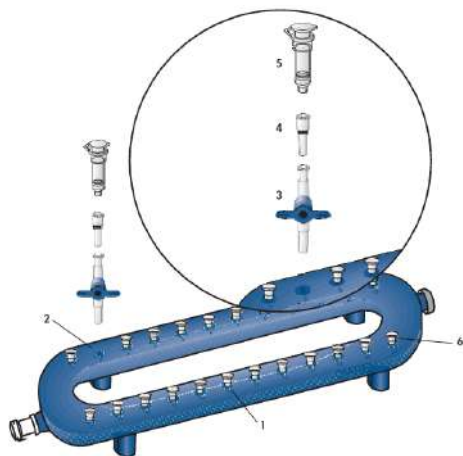


Figure 3. Setting up the QIAvac 24 Plus with QIAamp Mini columns using VacValves and VacConnectors.

- | | | | |
|---|---------------------------------|---|---------------------------------|
| 1 | QIAvac 24 plus vacuum manifold | 4 | VacConnector |
| 2 | Luer slot of the QIAvac 24 Plus | 5 | QIAamp Mini column |
| 3 | VacValve | 6 | Luer slot closed with luer plug |



Figure 4. Assembly of QIAamp Mini columns with extension tubes (for buccal swabs or large volumes).

- | | | | |
|---|--------------|---|--------------------|
| 1 | VacValve | 3 | QIAamp Mini Column |
| 2 | VacConnector | 4 | Extension tube* |

* Must be purchased separately

Processing QIAamp Mini columns on the QIAcube

Sample preparation using the QIAcube follows the same steps as the manual procedure (i.e., lyse, bind, wash, and elute). For more information about the automated procedure, see the relevant protocol sheet available at www.qiagen.com/MyQIAcube

Copurification of RNA

QIAamp Mini spin columns copurify DNA and RNA when both are present in the sample (see Table 3). RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions but will not inhibit PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 μL of an RNase A stock solution (100 mg/mL) should be added to the sample prior to the addition of Buffer AL. RNase A (cat. no. 19101) is not supplied with the kits and should be purchased separately. Ensure that the RNase A used is completely free of DNase activity.

Table 3. Yields of nucleic acids purified from various sources with QIAamp Kits

| Sample | Nucleic acid yield (μg) without RNase A treatment | DNA yield (μg) with RNase A treatment |
|------------------------------------|--|--|
| Blood (200 μL) | 4–12 | 4–12 |
| Buffy coat (200 μL) | 25–50 | 25–50 |
| Cultured cells (5×10^6) | 20–30 | 15–20 |
| Liver (25 mg) | 60–115 | 10–30 |
| Brain (25 mg) | 35–60 | 15–30 |
| Lung (25 mg) | 8–20 | 5–10 |
| Heart (25 mg) | 25–45 | 5–10 |
| Kidney (25 mg) | 40–85 | 15–30 |
| Spleen (10 mg) | 25–45 | 5–30 |

DNA was purified with the QIAamp kits following the standard protocols.

Elution mode for maximum yield or concentration

The yield of genomic DNA depends on the sample type and the number of cells in the sample. Typically, a 200 μL sample of whole blood from a healthy individual will yield 3–12 μg of DNA. (If higher yields are required, use QIAamp DNA Blood Midi or QIAamp DNA Blood Maxi Kits with up to 2 mL or up to 10 mL blood, respectively.) For most whole blood samples, a single elution with 200 μL elution buffer is sufficient. Samples with elevated white blood cell (WBC) counts, ranging from 1×10^7 to 1.5×10^7 cells/mL will yield between 13 and 20 μg of DNA. If such a sample is loaded onto the column, approximately 80% of the DNA will elute in the first 200 μL and up to 20% more in the next 200 μL . In samples with WBC counts exceeding 1.5×10^7 cells/mL, up to 60% of the DNA will elute in the first 200 μL and up to 70% of the remaining material in each subsequent 200 μL (see Table 4). Elution into a fresh tube is recommended to prevent dilution of the first eluate. More than 200 μL should not be eluted into a 1.5 mL microcentrifuge tube because the spin column will contact the eluate, leading to possible aerosol formation of samples during centrifugation. Eluting in $4 \times 100 \mu\text{L}$ instead of $2 \times 200 \mu\text{L}$ does not increase elution efficiency. In all cases, a single elution with 200 μL of elution buffer will provide sufficient DNA to perform multiple amplification reactions.

For some downstream applications, concentrated DNA may be required. Elution with volumes of less than 200 μL increases the final DNA concentration in the eluate significantly but slightly reduces overall DNA yield (see Table 5). For samples containing $<3 \mu\text{g}$ of DNA, eluting the DNA in 100 μL is recommended. For samples containing less than 1 μg of DNA, only one elution in 50 μL Buffer AE or water is recommended.

Table 4. Total nucleic acid yields with QIAamp Kits using successive elutions

| Sample | Amount | Yield (µg) | | | Total |
|-------------|--------------------------------------|------------|-----------|-----------|--------|
| | | Elution 1 | Elution 2 | Elution 3 | |
| Whole blood | 200 µL | 3–8 | 1–2 | 0–2 | 4–12 |
| Lymphocytes | 5 x 10 ⁶ cells/ 200 µL | 13–18 | 5–8 | 3–5 | 20–30 |
| Buffy coat | 200 µL | 15–25 | 8–15 | 5–10 | 28–50 |
| Liver* | 25 mg | 25–45 | 25–45 | 10–25 | 60–115 |
| Brain* | 25 mg | 20–30 | 10–20 | 5–10 | 35–60 |
| Lung* | 25 mg | 5–10 | 2–6 | 1–4 | 8–20 |
| Heart* | 25 mg | 15–25 | 8–15 | 2–5 | 25–45 |
| Kidney* | 25 mg | 25–40 | 20–30 | 5–15 | 50–85 |
| Spleen* | 10 mg | 15–25 | 8–15 | 2–5 | 25–45 |

DNA was purified with QIAamp Kits following standard protocols. Successive elutions were each performed with 200 µL Buffer AE.

* Results refer to the QIAamp DNA Mini Kit only.

Table 5. Effect of elution volume on yield and concentration

| Elution volume | Yield (µg) | Yield (%) | DNA concentration (ng/µL) |
|----------------|------------|-----------|---------------------------|
| 200 | 6.80 | 100 | 34.0 |
| 150 | 6.51 | 95 | 43.4 |
| 100 | 6.25 | 92 | 62.5 |
| 50 | 5.84 | 86 | 116.8 |

DNA was purified with QIAamp Kits following standard protocols. Average values obtained from 20 preparations are shown.

Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, and body fluids using a microcentrifuge. For total DNA purification using a vacuum manifold, see “Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Vacuum Protocol)” on page 42.

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).
- A total of 200 µL of whole blood yields 3–12 µg of DNA. Preparation of buffy coat (see page 26) is recommended if a higher yield is required.

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C for use in step 4.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Pipet 20 μL QIAGEN Protease (or proteinase K) into the bottom of a 1.5 mL microcentrifuge tube.
2. Add 200 μL sample to the microcentrifuge tube. Use up to 200 μL whole blood, plasma, serum, buffy coat, or body fluids, or up to 5×10^6 lymphocytes in 200 μL PBS.

If the sample volume is less than 200 μL , add the appropriate volume of PBS. QIAamp Mini spin columns copurify RNA and DNA when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 μL of an RNase A stock solution (100 mg/mL) should be added to the sample before addition of Buffer AL.

Note: It is possible to add QIAGEN Protease (or proteinase K) to samples that have already been dispensed into microcentrifuge tubes. In this case, it is important to ensure proper mixing after adding the enzyme.

3. Add 200 μL Buffer AL to the sample. Mix by pulse-vortexing for 15 s.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

If the sample volume is larger than 200 μL , increase the amount of QIAGEN Protease (or proteinase K) and Buffer AL proportionally; for example, a 400 μL sample will require 40 μL QIAGEN Protease (or proteinase K) and 400 μL Buffer AL. If sample volumes larger than 400 μL are required, use of QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits is recommended; these can process up to 2 mL or up to 10 mL of sample, respectively.

Note: Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

4. Incubate at 56°C for 10 min.

DNA yield reaches a maximum after lysis for 10 min at 56°C. Longer incubation times have no effect on yield or quality of the purified DNA.

5. Briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.
6. Add 200 μ L ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

If the sample volume is greater than 200 μ L, increase the amount of ethanol proportionally; for example, a 400 μ L sample will require 400 μ L of ethanol.

7. Carefully apply the mixture from step 6 to the QIAamp Mini spin column (in a 2 mL collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.

Close each spin column to avoid aerosol formation during centrifugation.

Centrifugation is performed at 6000 \times g (8000 rpm) to reduce noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the lysate has not completely passed through the column after centrifugation, centrifuge again at higher speed until the QIAamp Mini spin column is empty.

Note: When preparing DNA from buffy coat or lymphocytes, centrifugation at full speed is recommended to avoid clogging.

8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 μ L Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.

It is not necessary to increase the volume of Buffer AW1 if the original sample volume is larger than 200 μ L.

Note: Flow through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

9. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 μL Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 $\times g$; 14,000 rpm) for 3 min.
10. **Recommended:** Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 mL collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

11. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 200 μL Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min, and then centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp Mini spin column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

A second elution step with a further 200 μL Buffer AE will increase yields by up to 15%.

Volumes of more than 200 μL should not be eluted into a 1.5 mL microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation.

Elution with volumes of less than 200 μL increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces the overall DNA yield (see Table 5, page 36). For samples containing less than 1 μg of DNA, elution in 50 μL Buffer AE or water is recommended. Eluting with 2 \times 100 μL instead of 1 \times 200 μL does not increase elution efficiency.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and storing at -30°C to -15°C is recommended, because DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

A 200 μL sample of whole human blood (approximately 5×10^6 leukocytes/mL) typically yields 6 μg of DNA in 200 μL water (30 ng/ μL) with an A_{260}/A_{280} ratio of 1.7–1.9.

For more information about elution and how to determine DNA yield, purity, and length, refer to Table 4 (page 36) and Appendix A (page 69).

Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Vacuum Protocol)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from whole blood, plasma, serum, lymphocytes, and body fluids using the QIAvac 24 Plus or equivalent vacuum manifold. For total DNA purification using a microcentrifuge, see “Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)” on page 37.

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- For setup of the QIAvac 24 Plus, see page 28.
- Switch off vacuum between steps to ensure that a consistent, even vacuum is applied during protocol steps.
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).
- A total of 200 µL of whole blood yields 3–12 µg of DNA.

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C for use in step 4.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Pipet 20 μL QIAGEN Protease (or proteinase K) into the bottom of a 1.5 mL microcentrifuge tube.
2. Add 200 μL sample to the microcentrifuge tube. Use up to 200 μL whole blood, plasma, serum, or body fluids, or up to 5×10^6 lymphocytes in 200 μL PBS.

If the sample volume is less than 200 μL , add the appropriate volume of PBS.

QIAamp Mini columns copurify RNA and DNA when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 μL of an RNase A stock solution (100 mg/mL) should be added to the sample before addition of Buffer AL.

Note: It is possible to add QIAGEN Protease (or proteinase K) to samples that have already been dispensed into microcentrifuge tubes. In this case, it is important to ensure proper mixing after adding the enzyme.

3. Add 200 μL Buffer AL to the sample. Mix by pulse-vortexing for 15 s.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

If the sample volume is larger than 200 μL , increase the amount of QIAGEN Protease (or proteinase K) and Buffer AL proportionally; for example, a 400 μL sample will require 40 μL QIAGEN Protease (or proteinase K) and 400 μL Buffer AL. If sample volumes larger than 400 μL are required, use of QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits is recommended; these can process up to 2 mL or up to 10 mL of sample, respectively.

Note: Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

4. Incubate at 56°C for 10 min.

DNA yield reaches a maximum after lysis for 10 min at 56°C. Longer incubation times have no effect on yield or quality of the purified DNA.

5. Briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.
6. Add 200 μL ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

If the sample volume is greater than 200 μL , increase the amount of ethanol proportionally; for example, a 400 μL sample will require 400 μL of ethanol.

7. Insert the QIAamp Mini column into the VacConnector on the QIAvac vacuum manifold. Carefully apply the mixture from step 6 to the QIAamp Mini column without wetting the rim. Switch on the vacuum pump. Be sure to leave the lid of the QIAamp Mini column open while applying vacuum. After all lysates have been drawn through the spin column, switch off the vacuum pump.

The collection tube from the blister pack can be saved for the centrifugation in step 10.

If at this stage all of the solution has not passed through the membrane, place the QIAamp Mini column into a clean 2 mL collection tube (provided), close the cap, and centrifuge at $6000 \times g$ (8000 rpm) for 3 min or until all the liquid has completely passed through. Place the QIAamp Mini column into another clean 2 mL collection tube, and discard the tube containing the filtrate. Continue with step 8 of the spin protocol on page 27.

Note: Flow through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

8. Apply 750 μL Buffer AW1 to the QIAamp Mini column without wetting the rim. Leave the lid of the QIAamp Mini column open and switch on the vacuum pump. After all of Buffer AW1 has been drawn through the QIAamp Mini column, switch off the vacuum pump.

9. Add 750 μL Buffer AW2 without wetting the rim of the QIAamp Mini column. Leave the lid of the QIAamp Mini column open and switch on the vacuum pump. After all of Buffer AW2 has been drawn through the QIAamp Mini column, switch off the vacuum pump.
10. Close the lid of the QIAamp Mini column, remove it from the vacuum manifold, and discard the VacConnector. Place the QIAamp Mini column into a clean 2 mL collection tube and centrifuge at $20,000 \times g$ (14,000 rpm) for 1 min to dry the membrane completely.
11. Place the QIAamp Mini column in a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini column. Add 200 μL Buffer AE or distilled water equilibrated to room temperature (15–25°C). Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge at $6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp Mini column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

A second elution step with a further 200 μL Buffer AE will increase yields by up to 15%.

Volumes of more than 200 μL should not be eluted into a 1.5 mL microcentrifuge tube because the QIAamp Mini column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation.

Elution with volumes of less than 200 μL increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces overall DNA yield (see Table 5, page 36). For samples containing less than 1 μg of DNA, elution in 50 μL Buffer AE or water is recommended. Eluting with $2 \times 100 \mu\text{L}$ instead of $1 \times 200 \mu\text{L}$ does not increase elution efficiency.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and storing at -30°C to -15°C is recommended, since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

A 200 μL sample of whole human blood (approx. 5×10^6 leukocytes/mL) typically yields 6 μg of DNA in 200 μL water (30 ng/ μL) with an A_{260}/A_{280} ratio of 1.7–1.9.

For more information about elution and how to determine DNA yield, purity, and length, refer to Table 4 (page 36) and Appendix A (page 69).

Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from tissues using the QIAamp DNA Mini Kit.

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).
- Avoid repeated freezing and thawing of stored samples, since this leads to reduced DNA size.
- Transcriptionally active tissues, such as liver and kidney, contain high levels of RNA that will copurify with genomic DNA. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions but will not inhibit PCR. If RNA-free genomic DNA is required, include the RNase A digest, as described in step 5a of the protocol.

Things to do before starting

- Equilibrate the sample to room temperature (15–25°C).
- Heat two water baths or heating blocks: one to 56°C for use in step 3, and one to 70°C for use in step 5.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 16.
- If a precipitate has formed in Buffer ATL or Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Excise the tissue sample or remove it from storage. Determine the amount of tissue. Do not use more than 25 mg (10 mg spleen).

Weighing tissue is the most accurate way to determine the amount.

If DNA is prepared from spleen tissue, no more than 10 mg should be used.

The yield of DNA will depend on both the amount and the type of tissue processed. 1 mg of tissue will yield approximately 0.2–1.2 μg of DNA.

2. Cut up (step 2a), grind (step 2b), or mechanically disrupt (step 2c) the tissue sample. The QIAamp procedure requires no mechanical disruption of the tissue sample, but lysis time will be reduced if the sample is ground in liquid nitrogen (step 2b) or mechanically homogenized (step 2c) in advance.
 - a. Cut up to 25 mg of tissue (up to 10 mg spleen) into small pieces. Place in a 1.5 mL microcentrifuge tube, and add 180 μL of Buffer ATL. Proceed with step 3.

It is important to cut the tissue into small pieces to decrease lysis time. Microcentrifuge tubes (2 mL) may be better suited for lysis.

- b. Place up to 25 mg of tissue (10 mg spleen) in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into 1.5 mL microcentrifuge tube. Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw, and add 180 μL of Buffer ATL. Proceed with step 3.
- c. Add up to 25 mg of tissue (10 mg spleen) to a 1.5 mL microcentrifuge tube containing no more than 80 μL PBS. Homogenize the sample using the TissueRuptor or equivalent rotor–stator homogenizer. Add 100 μL Buffer ATL, and proceed with step 3.

Some tissues require undiluted Buffer ATL for complete lysis. In this case, grinding in liquid nitrogen is recommended. Samples cannot be homogenized directly in Buffer ATL, which contains detergent.

3. Add 20 μL proteinase K, mix by vortexing, and incubate at 56°C until the tissue is completely lysed. Vortex occasionally during incubation to disperse the sample, or place in a shaking water bath or on a rocking platform.

Note: Proteinase K must be used. QIAGEN Protease has reduced activity in the presence of Buffer ATL.

Lysis time varies depending on the type of tissue processed. Lysis is usually complete in 1–3 h. Lysis overnight is possible and does not influence the preparation. To ensure efficient lysis, a shaking water bath or a rocking platform should be used. If not available, vortexing 2–3 times per hour during incubation is recommended.

4. Briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.
5. If RNA-free genomic DNA is required, follow step 5a. Otherwise, follow step 5b.

Transcriptionally active tissues, such as liver and kidney, contain high levels of RNA that will copurify with genomic DNA. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions but will not inhibit PCR.

- a. First add 4 μL RNase A (100 mg/mL), mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate for 2 min at room temperature (15–25°C). Briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid before adding 200 μL Buffer AL to the sample. Mix again by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.

It is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL. In most cases it will dissolve during incubation at 70°C. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

- b. Add 200 μ L Buffer AL to the sample, mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.

It is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

- c. A white precipitate may form on addition of Buffer AL, which in most cases will dissolve during incubation at 70°C. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.
6. Add 200 μ L ethanol (96–100%) to the sample, and mix by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.

It is essential that the sample, Buffer AL, and the ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form on addition of ethanol. It is essential to apply all of the precipitate to the QIAamp Mini spin column. This precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

Do not use alcohols other than ethanol because this may result in reduced yields.

7. Carefully apply the mixture from step 6 (including the precipitate) to the QIAamp Mini spin column (in a 2 mL collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 \times *g* (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.

Note: Flow through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach.

Close each spin column to avoid aerosol formation during centrifugation.

It is essential to apply all of the precipitate to the QIAamp Mini spin column.

Centrifugation is performed at 6000 x g (8000 rpm) to reduce noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the solution has not completely passed through the membrane, centrifuge again at a higher speed until all the solution has passed through.

- Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µL Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.

Note: Flow through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach.

- Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µL Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min.
- Recommended:** Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 mL collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

- Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 200 µL Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.
- Repeat step 11.

A 5 min incubation of the QIAamp Mini spin column loaded with Buffer AE or water, before centrifugation, generally increases DNA yield.

A third elution step with a further 200 µL Buffer AE will increase yields by up to 15%.

Volumes of more than 200 μL should not be eluted into a 1.5 mL microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation.

Elution with volumes of less than 200 μL increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces the overall DNA yield (see Table 5, page 36). Eluting with 4 x 100 μL instead of 2 x 200 μL does not increase elution efficiency.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and placing at -30°C to -15°C is recommended, since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

Yields of DNA will depend both on the amount and the type of tissue processed. 25 mg of tissue will yield approximately 10–30 μg of DNA in 400 μL of water (25–75 $\text{ng}/\mu\text{L}$), with an A_{260}/A_{280} ratio of 1.7–1.9.

For more information about elution and how to determine DNA yield, length, and purity, refer to Table 4 (page 36) and Appendix A (page 69).

Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from buccal swabs using a microcentrifuge. For total DNA purification using a vacuum manifold, see “Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Vacuum Protocol)” on page 57.

Important points before starting

- Due to the increased volume of Buffer AL that is required for the buccal swab protocol, fewer preparations can be performed. Additional Buffer AL can be purchased separately.
- This protocol is recommended for the following swab types: C.E.P. (Omni Swabs from Whatman Bioscience, www.whatman.com), cotton, and DACRON (Daigger, Puritan® applicators with plastic stick and cotton or DACRON tip from Hardwood Products Company, www.hwppuritan.com, or from Hain Diagnostika, www.hain-diagnostika.de).
- To collect a sample, scrape the swab firmly against the inside of each cheek six times. Air-dry the swab for at least 2 hour after collection. Ensure that the person providing the sample has not consumed any food or drink in the 30 minutes prior to sample collection.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).

Things to do before starting

- Prepare a 56°C water bath for use in step 3.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature (15–25°C) for elution in step 10.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Place buccal swab in a 2 mL microcentrifuge tube. Add 400 μ L (cotton and DACRON swab) or 600 μ L (Omni Swab) PBS to the sample.

The Omni Swab is ejected into the microcentrifuge tube by pressing the stem end toward the swab. Cotton or DACRON swabs are separated from the stick by hand or with scissors.

QIAamp Mini spin columns copurify RNA and DNA in parallel when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 μ L of an RNase A stock solution (100 mg/mL) should be added to the sample prior to the addition of Buffer AL.

2. Add 20 μ L QIAGEN Protease stock solution (or proteinase K) and 400 μ L (cotton or DACRON swab) or 600 μ L (Omni Swab) Buffer AL to the sample. Mix immediately by vortexing for 15 s.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed immediately and thoroughly.

Note: Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

3. Incubate at 56°C for 10 min. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

4. Add 400 μL (cotton or DACRON swab) or 600 μL (Omni Swab) ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by vortexing. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.
5. Carefully apply 700 μL of the mixture from step 4 to the QIAamp Mini spin column (in a 2 mL collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.

Close each spin column to avoid aerosol formation during centrifugation.

6. Repeat step 5 by applying up to 700 μL of the remaining mixture from step 4 to the QIAamp Mini spin column.
7. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 μL Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.
8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 μL Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 $\times g$; 14,000 rpm) for 3 min.
9. **Recommended:** Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 mL collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

10. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 150 μL Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min, and then centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min.

Elution with 100 μL buffer increases the final DNA concentration in the eluate significantly but may slightly reduce the overall DNA yield. Elution with volumes of less than 100 μL is not recommended as the overall DNA yield decreases dramatically.

A second elution step with the same 150 μL eluate containing the DNA will increase yield significantly. However this is not recommended when using the eluate for PCR.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and placing at -30°C to -15°C is recommended.

One buccal swab typically yields 0.5–3.5 μg of DNA in 150 μL of buffer (3–23 $\text{ng}/\mu\text{L}$), with A_{260}/A_{280} ratios of 1.7–1.9 (measured in water).

Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Vacuum Protocol)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from buccal swabs using the QIAvac 24 Plus or equivalent vacuum manifold. For total DNA purification using a microcentrifuge, see “Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol)” on page 53.

Important points before starting

- Due to the increased volume of Buffer AL that is required for the buccal swab protocol, fewer preparations can be performed. Additional Buffer AL can be purchased separately.
- This protocol is recommended for the following swab types: C.E.P. (Omni Swabs from Whatman Bioscience, www.whatman.com), cotton, and DACRON (Daigger, Puritan applicators with plastic stick and cotton or DACRON tip from Hardwood Products Company, www.hwppuritan.com, or from Hain Diagnostika, www.hain-diagnostika.de).
- To collect a sample, scrape the swab firmly against the inside of each cheek six times. Air-dry the swab for at least 2 hours after collection. Ensure that the person providing the sample has not consumed any food or drink in the 30 minutes prior to sample collection.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- For setup of the QIAvac 24 Plus, see page 28.
- Switch off the vacuum between steps to ensure that a consistent, even vacuum is applied during protocol steps.

Things to do before starting

- Prepare a 56°C water bath for use in step 3.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature (15–25°C) for elution in step 10.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Place buccal swab in a 2 mL microcentrifuge tube. Add 400 μ L (cotton and DACRON swab) or 600 μ L (Omni Swab) PBS to the sample.

The Omni Swab is ejected into the microcentrifuge tube by pressing the stem end toward the swab. Cotton or DACRON swabs are cut from the stick by hand or with scissors.

QIAamp Mini columns copurify RNA and DNA in parallel when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not the PCR itself. If RNA-free genomic DNA is required, 4 μ L RNase A stock solution (100 mg/mL) should be added to the sample prior to the addition of Buffer AL.

2. Add 20 μ L QIAGEN Protease stock solution (or proteinase K) and 400 μ L (cotton or DACRON swab) or 600 μ L (Omni Swab) of Buffer AL to the sample. Mix immediately by vortexing for 15 s.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed immediately.

Note: Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

3. Incubate at 56°C for 10 min. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

4. Add 400 μL (cotton or DACRON swab) or 600 μL (Omni Swab) ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by vortexing.
5. Insert the QIAamp Mini column into a VacConnector on the QIAvac vacuum manifold. Place an extension tube on the column. Seal unused Luer Adapters with Luer plugs.
6. Apply the mixture from step 4 to the QIAamp Mini column. Switch on the vacuum pump to draw the lysate through the QIAamp Mini column. After the lysate has passed through the QIAamp Mini column, switch off the vacuum pump.
7. Add 750 μL Buffer AW1 into the extension tube. Switch on the vacuum pump to draw Buffer AW1 through the QIAamp Mini column. Switch off the vacuum pump. Carefully remove the extension tube from the QIAamp Mini column and discard.
8. Add 750 μL Buffer AW2 without wetting the rim of the QIAamp Mini column. Leave the lid of the QIAamp Mini column open and switch on the vacuum pump. After all of Buffer AW2 has been drawn through the spin column, switch off the vacuum pump.
9. Close the lid of the QIAamp Mini column, remove it from the vacuum manifold, and discard the VacConnector. Place the QIAamp Mini column into a clean 2 mL collection tube and centrifuge at 20,000 $\times g$ (14,000 rpm) for 1 min to dry the membrane completely.
10. Place the QIAamp Mini column in a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Discard the collection tube and the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini column. Elute the DNA with 150 μL Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min, and then centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min.

Elution with 100 μL buffer increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but may slightly reduce the overall DNA yield. Elution with volumes of less than 100 μL is not recommended as overall DNA yield decreases dramatically.

A second elution step with the same 150 μL eluate containing the DNA will increase yield significantly. However this is not recommended when using the eluate for PCR.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and placing at -30°C to -15°C is recommended.

One buccal swab typically yields 0.5–3.5 μg DNA in 150 μL buffer (3–23 $\text{ng}/\mu\text{L}$), with A_{260}/A_{280} ratios of 1.7–1.9 (measured in water).

Protocol: DNA Purification from Dried Blood Spots (QIAamp DNA Mini Kit)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from blood, both untreated and treated with anticoagulants, which has been spotted and dried on filter paper (Schleicher and Schuell 903).

Important point before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).

Things to do before starting

- Prepare an 85°C water bath for use in step 2, a 56°C water bath for use in step 3, and a 70°C water bath for use in step 4.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature (15–25°C) for elution in step 10.
- Ensure that Buffer AW1 and Buffer AW2 have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL or Buffer ATL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Place 3 punched-out circles from a dried blood spot into a 1.5 mL microcentrifuge tube and add 180 µL of Buffer ATL.

Cut 3 mm (1/8 inch) diameter punches from a dried blood spot with a single-hole paper puncher.
2. Incubate at 85°C for 10 min. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

3. Add 20 μL proteinase K stock solution. Mix by vortexing, and incubate at 56°C for 1 h. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

The addition of proteinase K is essential.

4. Add 200 μL Buffer AL to the sample. Mix thoroughly by vortexing, and incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed immediately and thoroughly.

Do not add proteinase K directly to Buffer AL.

A white precipitate may form when Buffer AL is added to the sample. In most cases, the precipitate will dissolve during incubation. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

5. Add 200 μL ethanol (96–100%) to the sample, and mix thoroughly by vortexing. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

It is essential that the sample and ethanol are mixed thoroughly.

6. Carefully apply the mixture from step 5 to the QIAamp Mini spin column (in a 2 mL collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at $6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.

Note: Flow through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach.

Close each QIAamp Mini spin column to avoid aerosol formation during centrifugation.

7. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 μL Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at $6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.

8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 μL Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 $\times g$; 14,000 rpm) for 3 min.
9. **Recommended:** Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 mL collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

10. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 150 μL Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min, and then centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min.

Three punched-out circles (3 mm diameter) typically yield 150 ng and 75 ng of DNA from anticoagulated and untreated blood, respectively. If the yield from untreated blood is not sufficient, use 6 circles per prep instead of 3.

The volume of the DNA eluate used in a PCR assay should not exceed 10%; for example, for a 50 μL PCR, add no more than 5 μL of eluate.

Troubleshooting Guide

This troubleshooting guide may be helpful in solving any problems that may arise. For more information, see also the Frequently Asked Questions page at our Technical Support Center: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. The scientists in QIAGEN Technical Services are always happy to answer any questions you may have about either the information and protocols in this handbook or sample and assay technologies (for contact information, see back cover or visit www.qiagen.com).

Comments and suggestions

Colored residues remain on the QIAamp Mini spin column after washing

| | |
|--|---|
| Inefficient cell lysis due to insufficient mixing of the sample with Buffer AL | Repeat the DNA purification procedure with a new sample. Be sure to mix the sample and Buffer AL immediately and thoroughly by pulse-vortexing. |
|--|---|

| | |
|---|---|
| Inefficient cell lysis due to decreased protease activity | Repeat the DNA purification procedure with a new sample and with freshly prepared QIAGEN Protease stock solution. Be sure to store the stock solution at 2–8°C immediately after use. Ensure that QIAGEN Protease is not added directly to Buffer AL. |
|---|---|

| | |
|---|--|
| No ethanol added to the lysate before loading onto the QIAamp Mini column | Repeat the purification procedure with a new sample. |
|---|--|

| | |
|--|--|
| Buffer AW1 or AW2 prepared incorrectly | Ensure that Buffer AW1 and AW2 concentrates were diluted with the correct volumes of pure ethanol (see page 23). Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone. Repeat the purification procedure with a new sample. |
|--|--|

Little or no DNA in the eluate

| | |
|---|--|
| Low concentration of cells or viruses in the sample | Concentrate a larger volume of a new cell-free sample to 200 µL using a Centricon® 100 (Amicon, USA). Repeat the DNA purification procedure, adding 5–10 µg of carrier DNA to each lysate (see page 24) if the sample has a low DNA content. If whole blood was used, prepare buffy coat (see procedure on page 26). |
|---|--|

Comments and suggestions

| | |
|--|---|
| Inefficient cell lysis due to insufficient mixing with Buffer AL | Repeat the DNA purification procedure with a new sample. Be sure to mix the sample and Buffer AL immediately and thoroughly by pulse-vortexing. |
| Inefficient cell lysis due to decreased protease activity | Repeat the DNA purification procedure with a new sample and with freshly prepared QIAGEN Protease stock solution. Be sure to store the stock solution at 2–8°C immediately after use. Ensure that QIAGEN Protease is not added directly to Buffer AL. |
| Inefficient cell lysis or protein degradation in Buffer AL or Buffer ATL due to insufficient incubation time | Repeat the procedure with a new sample. Ensure that the tissue sample is cut into small pieces and extend the incubation time. Ensure that no residual particulates are visible (bones or hair will not be lysed at all). |
| Inefficient cell lysis due to decreased protease activity | Repeat the DNA purification procedure with a new sample and with freshly prepared QIAGEN Protease stock solution. Be sure to store the stock solution at 2–8°C immediately after use. Ensure that QIAGEN Protease is not added directly to Buffer AL. |
| No ethanol added to the lysate before loading onto the QIAamp Mini column | Repeat the purification procedure with a new sample. |
| Low-percentage ethanol used instead of 100% | Repeat the purification procedure with a new sample. Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone. |
| Isopropanol used instead of ethanol with samples other than blood or plasma | We strictly recommend the use of ethanol with all samples other than blood or plasma (serum). The use of isopropanol results in reduced yields with all other samples. |
| QIAamp Mini column not incubated at room temperature (15–25°C) for 1 min | After addition of Buffer AE or water, the QIAamp Mini column should be incubated at room temperature for at least 1 min. |
| DNA not eluted efficiently | To increase elution efficiency, pipet Buffer AE or water onto the center of the QIAamp Mini column and incubate the column for 5 min at room temperature before centrifugation. |
| pH of water incorrect (acidic) | Low pH may reduce DNA yield. Ensure that the pH of the water is at least 7.0 or use Buffer AE for elution. |

Comments and suggestions

| | |
|--|--|
| Buffer AW1 or AW2 prepared incorrectly | Check that Buffer AW1 and AW2 concentrates were diluted with the correct volumes of pure ethanol (see page 23). Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone. Repeat the purification procedure with a new sample. |
| Buffer AW1 or AW2 prepared with 70% ethanol | Check that Buffer AW1 and AW2 concentrates were diluted with 96–100% ethanol. Repeat the purification procedure with a new sample. |
| Buffers AW1 and AW2 used in the wrong order | Ensure that Buffers AW1 and AW2 are used in the correct order in the protocol. Repeat the purification procedure with a new sample. |
| Elution with too much Buffer AE | Elution with volumes of less than 200 µL increases the final DNA concentration in the eluate, but slightly reduces the overall DNA yield (see Table 5 on page 36). For samples containing less than 1 µg of DNA, elution in 50 µL of Buffer AE or water is always recommended. |
| A₂₆₀/A₂₈₀ ratio for purified nucleic acids is low | |
| Inefficient cell lysis due to insufficient mixing with Buffer AL | Repeat the procedure with a new sample. Be sure to mix the sample and Buffer AL immediately and thoroughly by pulse-vortexing. |
| Inefficient cell lysis due to decreased protease activity | Repeat the DNA purification procedure with a new sample and with freshly prepared QIAGEN Protease stock solution. Be sure to store the stock solution at 2–8°C immediately after use. Ensure that QIAGEN Protease is not added directly to Buffer AL. |
| Inefficient cell lysis or protein degradation in Buffer AL or Buffer ATL due to insufficient incubation time | Repeat the procedure with a new sample. Extend the incubation time. Take care that no residual particulates are visible (bones or hair will not be lysed at all). |
| No ethanol added to the lysate before loading onto the QIAamp Mini column | Repeat the purification procedure with a new sample. |
| Low percentage ethanol used instead of 100% | Repeat the purification procedure with a new sample. |
| Buffer AW1 or AW2 prepared incorrectly | Check that Buffer AW1 and AW2 concentrates were diluted with the correct volumes of pure ethanol (see page 23). Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone. Repeat the purification procedure with a new sample. |

Comments and suggestions

| | |
|---|---|
| Buffer AW1 or AW2 prepared with 70% ethanol | Check that Buffer AW1 and AW2 concentrates were diluted with 96–100% ethanol. Repeat the purification procedure with a new sample. |
| Buffers AW1 and AW2 used in the wrong order | Ensure that Buffers AW1 and AW2 are used in the correct order in the protocol. Repeat the purification procedure with a new sample. |
| A₂₆₀/A₂₈₀ ratio for purified nucleic acids is high | |
| High level of residual RNA | In future DNA preparations, use the optional RNase step included in the protocols. |
| Buffer AL added to the sample | Always add RNase A first and vortex when before addition of RNase A using the optional RNase A step. |

DNA does not perform well in subsequent enzymatic reactions

| | |
|--|--|
| Not enough DNA in sample | <p>Check “Little or no DNA in the eluate” in this troubleshooting guide for possible reasons. Increase the amount of eluate added to the reaction, if possible. If necessary, vacuum-concentrate the DNA or increase the amount of sample used, and repeat the purification procedure. If the amount of purified DNA is still expected to be low, reduce the elution volume to 50 µL.</p> <p>Lowering the elution volume will slightly reduce the overall yield, but will result in a higher concentration of nucleic acids in the eluate (see Table 5 on page 36). DNA remaining on the QIAamp Mini column can be recovered in a subsequent elution step by applying the same eluate to the column.</p> |
| Inhibitory substances in preparation | Check “A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio for purified nucleic acids is low” for possible reasons |
| Residual Buffer AW2 in the eluate | Use recommended drying step in the relevant protocol. Ensure that the QIAamp Mini column does not come into contact with the filtrate prior to elution. |
| Buffers AW1 and AW2 used in the wrong order | Ensure that Buffers AW1 and AW2 are used in the correct order in the protocol. Repeat the purification procedure with a new sample. |
| High level of residual RNA | In future DNA preparations, use the optional RNase step included in the protocols. |
| Reduced sensitivity of amplification reaction | Adjust the volume of eluate added as template in the amplification reaction. Reoptimize the amplification system by adjusting the volume of eluate added. |
| Amplification reaction setup has been modified | Reoptimize the amplification system by adjusting the volume of eluate added. |

Comments and suggestions

White precipitate in Buffer ATL or Buffer AL

White precipitate may form after storage at low temperature or prolonged storage

Any precipitate in Buffer ATL or Buffer AL must be dissolved by incubation of the buffer at 56°C. The precipitate has no effect on function. Dissolving the precipitate at high temperature will not compromise yield or quality of the purified nucleic acids.

White precipitate in steps 5 or 6 of the tissue protocol

White precipitate may form after storage at low temperature or prolonged storage

In most cases the precipitate formed in step 5 will dissolve during incubation at 70°C. The precipitates do not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

General handling

Lysate not completely passed through the membrane

Using spin protocol: Centrifuge for 1 min at through the membrane full speed or until all the lysate has passed through the membrane.

Using vacuum protocol: Insufficient vacuum was applied or the lid of the QIAamp Mini column was closed during the vacuum step. Increase the vacuum, and open the lid while applying the vacuum. If the vacuum pressure cannot be increased, place the QIAamp Mini column in a clean 2 mL collection tube, close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 3 min or until the lysate has completely passed through the membrane. Place the QIAamp Mini column into another clean 2 mL collection tube, and discard the tube containing the filtrate. Continue with step 8 of the spin protocol on page 37.

Clogged membrane

Blood samples: Concentration of leukocytes in samples was greater than $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$. Dilute the sample with PBS and repeat the purification.

Plasma samples: Cryoprecipitates have formed in plasma due to repeated freezing and thawing. Do not use plasma that has been frozen and thawed more than once.

Cross contamination between samples

To avoid cross-contamination when handling QIAamp Mini columns, read "Handling of QIAamp Mini columns" on page 26. Repeat the purification procedure with new samples.

Vacuum pressure too high/too low

Using a vacuum pressure that is too high may damage the QIAamp membrane. Using a vacuum pressure that is too low may cause reduced DNA yield and purity. Use a vacuum regulator to adjust the pressure to -800 to 900 mbar for all vacuum steps.

Appendix A: Determination of Concentration, Yield, Purity, and Length of DNA

Determination of concentration, yield, and purity

DNA yields are determined from the concentration of DNA in the eluate, measured by absorbance at 260 nm. Purity is determined by calculating the ratio of absorbance at 260 nm to absorbance at 280 nm. Pure DNA has an A_{260}/A_{280} ratio of 1.7–1.9. Absorbance readings at 260 nm should lie between 0.1 and 1.0 to be accurate. Sample dilution should be adjusted accordingly. Use elution buffer or water (as appropriate) to dilute samples and to calibrate the spectrophotometer. Measure the absorbance at 260 and 280 nm, or scan absorbance from 220–320 nm (a scan will show if there are other factors affecting absorbance at 260 nm). Both DNA and RNA are measured with a spectrophotometer. To measure only DNA, a fluorometer must be used.

Determination of DNA length

The length of genomic DNA can be determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) through an agarose gel. The DNA should be concentrated by alcohol precipitation and reconstituted by gentle agitation in approximately 30 μ L TE buffer, pH 8.0,* for at least 30 minutes at 60°C. Avoid drying the DNA pellet for more than 10 minutes at room temperature (15–25°C) since over-dried genomic DNA is very difficult to redissolve. Load 3–5 μ g DNA per well. Standard PFGE conditions are as follows:

- 1% agarose gel in 0.5x TBE electrophoresis buffer*
- Switch intervals: 5–40 s
- Run time: 17 h
- Voltage: 170 V

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles.

Appendix B: Protocol for Cultured Cells

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from cultured cells using a microcentrifuge.

Additional equipment and reagents required

- Phosphate buffered saline (PBS)*
- Equipment for harvesting cells. Depending on the method chosen, one or more of the following are required:
 - Microcentrifuge
 - Trypsin and culture media*
 - Cell scraper

Important points before starting

- Do not use more than 5×10^6 cells (with a normal set of chromosomes).
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

Things to do before starting

- Heat a water bath or heating block to 56°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature (15–25°C) for elution.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Harvest cells according to step a (for cells grown in suspension) or b (for cells grown in a monolayer).
 - a. Cells grown in suspension (do not use more than 5×10^6 cells with a normal set of chromosomes): Determine the number of cells. Centrifuge the appropriate number of cells for 5 min at $300 \times g$ in a 1.5 mL microcentrifuge tube. Remove the supernatant completely and discard, taking care not to disturb the cell pellet. Continue with step 2.
 - b. Cells grown in a monolayer (do not use more than 5×10^6 cells with a normal set of chromosomes): Cells grown in a monolayer can be detached from the culture flask by either trypsinization or using a cell scraper.

To trypsinize cells:

Determine the number of cells. Aspirate the medium and wash cells with PBS. Aspirate the PBS, and add 0.10–0.25% trypsin. After cells have detached from the dish or flask, collect them in medium and transfer the appropriate number of cells (do not use more than 5×10^6 cells with a normal set of chromosomes) to a 1.5 mL microcentrifuge tube. Centrifuge for 5 min at $300 \times g$. Remove the supernatant completely and discard, taking care not to disturb the cell pellet. Continue with step 2.

Using a cell scraper:

Detach cells from the dish or flask. Transfer the appropriate number of cells (do not use more than 5×10^6 cells with a normal set of chromosomes) to a 1.5 mL microcentrifuge tube and centrifuge for 5 min at 300 x g. Remove the supernatant completely and discard, taking care not to disturb the cell pellet. Continue with step 2.

2. Resuspend cell pellet in PBS to a final volume of 200 μ L.
3. Add 20 μ L QIAGEN Protease or proteinase K.
4. Continue with step 3 of "Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)", page 37.

Appendix C: Protocols for Bacteria

These protocols have been used successfully for bacteria such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Bordetella pertussis* from nasopharyngeal swabs; *Borrelia burgdorferi* from cerebrospinal fluid; and *Legionella pneumophila* from broncho-alveolar lavage. For other bacteria, follow the protocol for Gram-positive bacteria, especially other Gram-positive bacteria, which may be difficult to lyse.

For isolation of bacterial DNA from urine, either follow the protocol for biological fluids, or use the QIAamp Viral RNA Mini Kit. Urine contains numerous unidentified PCR inhibitors. Buffer AVL (included in the QIAamp Viral RNA Mini Kit) is the buffer of choice to destroy these inhibitors.

Some bacteria (particularly Gram-positive bacteria) require pre-incubation with specific enzymes such as lysozyme* or lysostaphin* (e.g., staphylococci) to lyse the rigid multilayered cell wall. In these cases the protocol for Gram-positive bacteria should be used.

Additional reagents required

- **For swabs:** Phosphate-buffered saline (PBS)* containing a common fungicide*
- **For Gram-positive and difficult-to-lyse bacteria:** 20 mg/mL lysozyme or 200 µg/mL lysostaphin solution in 20 mM Tris·Cl,* pH 8.0, 2 mM EDTA,* 1.2% Triton®*

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).
- Avoid repeated freezing and thawing of stored samples, since this leads to reduced DNA size.

Things to do before starting

- Equilibrate the sample to room temperature (15–25°C).
- Heat 2 water baths or heating blocks: one to 56°C and one to 70°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer ATL or Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Isolation of bacterial DNA from biological fluids

1. Pellet bacteria by centrifugation for 10 min at 5000 x g (7500 rpm).
2. Resuspend bacterial pellet in 180 µL Buffer ATL (supplied in the QIAamp DNA Mini Kit).
3. Follow the “Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit)” from step 3 (page 47).

Isolation of bacterial DNA from eye, nasal, pharyngeal, or other swabs*

1. Collect samples and place in 2 mL PBS containing a common fungicide. Incubate for several hours at room temperature (15–25°C).
2. Follow the biological fluids protocol above from step 1.

Isolation of genomic DNA from bacterial plate cultures

1. Remove bacteria from culture plate with an inoculation loop and suspend in 180 µL of Buffer ATL (supplied in the QIAamp DNA Mini Kit) by vigorous stirring.
2. Follow the “Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit)” from step 3 (page 47).

Isolation of genomic DNA from bacterial suspension cultures

1. Pipet 1 mL of bacterial culture into a 1.5 mL microcentrifuge tube, and centrifuge for 5 min at 5000 x g (7500 rpm).
2. Calculate the volume of the pellet or concentrate and add Buffer ATL (supplied in the QIAamp DNA Mini Kit) to a total volume of 180 µL.
3. Follow the “Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit)” from step 3 (page 47).

*See also “Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol)” on page 53.

Isolation of genomic DNA from Gram-positive bacteria

1. Pellet bacteria by centrifugation for 10 min at 5000 x g (7500 rpm).
2. Suspend bacterial pellet in 180 µL of the appropriate enzyme solution (20 mg/mL lysozyme or 200 µg/mL lysostaphin; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA; 1.2% Triton).
3. Incubate for at least 30 min at 37°C.
4. Add 20 µL proteinase K and 200 µL Buffer AL. Mix by vortexing.
5. Incubate at 56°C for 30 min and then for a further 15 min at 95°C.

Note: Extended incubation at 95°C can lead to some DNA degradation.

6. Centrifuge for a few seconds.
7. Follow the "Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol)" from step 6 (page 47).

Appendix D: Protocol for Yeast (e.g., Cultured *Candida* spp.)

Additional reagents required

- Sorbitol buffer (1 M sorbitol, 100 mM EDTA, 14 mM β -mercaptoethanol)*
- Zymolase or lyticase*

Important points before starting

- Lysis time and yield will vary from sample to sample depending on the cell number and species processed. A total of 3 mL of log-phase culture will yield approximately 15–25 μ g of DNA in 400 μ L of water (37–62 ng/ μ L), with an A_{260}/A_{280} ratio of 1.6–1.8.
- A third elution with 200 μ L of Buffer AE or water will increase yield.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).
- Avoid repeated freezing and thawing of stored samples, since this leads to reduced DNA size.

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

Things to do before starting

- Equilibrate the sample to room temperature (15–25°C).
- Heat three water baths or heating blocks: one to 30°C, one to 56°C, and one to 70°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer ATL or Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Grow yeast culture in YPD medium to an OD₆₀₀ of 10.
2. Harvest 3 mL of culture by centrifuging for 10 min at 5000 x g (7500 rpm).
3. Resuspend the pellet in 600 µL sorbitol buffer. Add 200 U zymolase or lyticase and incubate at 30°C for 30 min.
4. Pellet the spheroplasts by centrifuging for 5 min at 5000 x g (7500 rpm).
5. Resuspend the spheroplasts in 180 µL Buffer ATL (supplied in the QIAamp DNA Mini Kit).
6. Follow the “Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit)” from step 3 (page 47).

Appendix E: Protocols for Viral DNA

For simultaneous purification of viral DNA and RNA from plasma or serum, we recommend using the QIAamp MinElute Virus Vacuum Kit or the QIAamp MinElute Virus Spin Kit. These kits provide viral nucleic acid purification with minimal elution volumes for higher sensitivity in downstream applications. All buffers and components of these kits are guaranteed to be RNase free. Viral nucleic acid purification using the QIAamp MinElute Virus Spin Kit can be fully automated on the QIAcube for increased standardization and ease of use.

Important points before starting

- Stool, plasma, serum, urine, cerebrospinal fluid, and other body fluids often contain very low numbers of cells or viruses. In these cases, concentrating samples from up to 3.5 mL to a final volume of 200 μ L, as described in the “Appendix J: Protocol for Sample Concentration” on page 93, is recommended.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Integrated viral DNA

Integrated viral DNA is prepared by the same procedures as genomic DNA (see standard protocols).

Free viral DNA from fluids or suspensions

For preparation of DNA from free viral particles in fluids or suspensions (other than urine) using the “Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluid” protocols we recommend the addition of 1 μL of an aqueous solution containing 5–10 μg of carrier DNA (e.g., poly dA, poly dT, poly dA:dT)* to 200 μL Buffer AL.

To ensure binding conditions are optimal, increase the volume of ethanol added at step 6 from 200 to 230 μL .

Elution should be in 60 μL Buffer AE.

Free viral DNA from stool

Additional equipment and reagents required

- 0.89% saline solution
- 0.22 μm filter

Procedure

1. Suspend 0.5–1.0 mL of a stool specimen in not more than 5 mL of 0.89% NaCl (maximum dilution 1:10).
2. Clarify the solution by centrifugation for 20 min at 4000 x *g*.
3. Filter supernatant through a 0.22 µm filter.

Filtration will remove cells from the sample, eliminating cellular DNA from the preparation.

4. Pipet 200 µL of the filtrate into a 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 20 µL QIAGEN Protease and continue with the “Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)” from step 3 (page 37).

Free viral DNA from eye, nasal, pharyngeal, or other swabs

Additional reagent required

- Phosphate-buffered saline (PBS) containing a common fungicide *

Procedure

- Collect samples and transfer to 2 mL PBS containing a common fungicide and bactericide. Incubate for 2–3 hours at room temperature (15–25°C).
- Concentrate the samples from 2 mL to 200 µL as described in the “Appendix J: Protocol for Sample Concentration” on page 93.
- Pipet 200 µL concentrate into a 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 20 µL QIAGEN Protease and continue with the “Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)” from step 3 (page 37).

Viral DNA from urine

- Use the QIAamp Viral RNA Mini Kit. Urine contains numerous unidentified PCR inhibitors. Buffer AVL (included in the QIAamp Viral RNA Mini Kit) is the buffer of choice to inactivate these inhibitors.
- Eluting the DNA in 50–100 µL elution buffer or water is recommended.

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

Appendix F: Protocols for Eye, Nasal, or Pharyngeal Swabs

Stool, plasma, serum, urine, cerebrospinal fluid, and other body fluids often contain very low numbers of cells or viruses. In these cases, concentrating samples from up to 3.5 mL to a final volume of 200 μ L, as described in the “Appendix J: Protocol for Sample Concentration” on page 93, is recommended.

DNA viruses

See “Appendix E: Protocols for Viral DNA” on page 80.

Bacteria

See “Appendix C: Protocols for Bacteria” on page 74.

Cells

Additional reagent required

- Phosphate-buffered saline (PBS) containing a common fungicide

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Collect samples and transfer into 2 mL PBS containing a common fungicide and bactericide. Incubate for 2–3 h at room temperature (15–25°C).
2. Concentrate the samples from 2 mL to 200 μ L as described in the “Appendix J: Protocol for Sample Concentration” on page 93. Alternatively pellet the cells by centrifuging for 10 min at 5000 \times *g* (7500 rpm).
3. Pipet 200 μ L concentrate into a 1.5 mL microcentrifuge tube. Alternatively resuspend the cell pellet in 200 μ L PBS. Add 20 μ L QIAGEN Protease and continue with the “Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)” from step 3 (page 37).

Eluting the DNA in 50–100 μ L of Buffer AE or water is recommended.

Appendix G: Protocol for Mitochondrial DNA from Platelets

Additional reagent required

- Due to the increased volumes of Buffer AL and QIAGEN Protease that are required for the following protocol, fewer preparations can be performed. Additional Buffer AL and QIAGEN Protease can be purchased separately.

Important point before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Draw blood in the presence of a common anticoagulant.
2. Take 8 mL of the blood and prepare platelet-rich plasma by centrifugation at 100 x g for 15 min at room temperature (15–25°C).

3. Transfer upper layer into a new tube and remove residual blood cells by centrifugation at 200 x g for 10 min at room temperature.
4. Transfer supernatant to a new tube.
5. Add 400 µL platelet suspension to a 1.5 mL microcentrifuge tube containing 40 µL QIAGEN Protease or proteinase K. Add 400 µL Buffer AL and mix thoroughly by vortexing.
6. Incubate at 56°C for 10 min. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.
7. Add 400 µL ethanol (96–100%), and mix again by vortexing. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.
8. Apply 620 µL of the lysate to the QIAamp Mini spin column (in a 2 mL collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.*
9. Apply the remainder of the lysate to the QIAamp Mini spin column without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube, and discard the tube containing the filtrate.
10. Continue with step 8 of the "Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)" (page 37).

Eluting the DNA in 50–100 µL of Buffer AE or water is recommended.

*Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

Appendix H: Protocol for CSF and Bone Marrow on Hematological Slides

Additional equipment and reagents required

- Phosphate-buffered saline (PBS)
- Clean microscope slide

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Moisten the dried material with a drop of PBS.
2. Add 180 μL PBS to a 1.5 mL microcentrifuge tube.
3. Scrape cytological material into the microcentrifuge tube using the edge of a clean slide.
4. Dissolve the resulting sludge by pipetting up and down.
5. Add 20 μL QIAGEN Protease and continue with the "Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)" from step 3 (page 37).

Appendix I: Protocol for Crude Cell Lysates and Other Samples

For preparation of genomic DNA from samples other than those listed in this handbook or for which specialized protocols are not available, the following procedure is recommended.

QIAGEN is continuously developing and optimizing QIAamp protocols for new sample sources not included in this handbook. Additional preliminary protocols developed by customers are available for bone, hair, nails, sperm, fungi, and many other sample types. Please contact one of our Technical Service Departments or your local distributor (see back cover or visit www.qiagen.com) for more information.

Additional reagent required

- Cell lysis buffer*

Important points before starting

- Optimal lysis conditions must first be found for the specific sample being processed. QIAamp lysis buffers are not suitable for all sample sources.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles.

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 37.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Lyse sample in the sample-specific lysis buffer in as small a volume as possible (200 µL of lysis buffer is optimal).
2. Estimate the volume of the lysate.
3. Add 20 µL proteinase K per 200 µL lysate.
4. Add 200 µL Buffer AL per 200 µL lysate.
5. Mix immediately by pulse-vortexing for 15 s.
6. Incubate at 56°C for 10 min. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.
7. Check the pH of the lysate. The pH must be acidic (<7.0) to obtain maximum binding of DNA to the QIAamp membrane.
8. Add 200 µL ethanol (96–100%) per 200 µL lysate, and mix again by pulse-vortexing for 15 s. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

9. Apply 620 μL of the lysate to the QIAamp Mini spin column (in a 2 mL collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.*
10. Repeat step 9 until the whole lysate is loaded. A maximum of 5 \times 620 μL can be loaded onto the QIAamp Mini spin column.
11. Continue with step 8 of the "Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)" (page 37).

Note: Yields will vary from sample to sample depending on the cell number and species processed.

*Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach.

Appendix J: Protocol for Sample Concentration

Plasma, serum, urine, cerebrospinal fluid, and other body fluids often contain very low numbers of cells, bacteria, or viruses. In these cases, concentrating samples from up to 3.5 mL to a final volume of 200 μ L is recommended.

Additional equipment required

- Centrifugal microconcentrators such as Amicon[®] Centricon-100 (Millipore, 2 mL), Microsep 100 (Filtron, 3.5 mL), and UltraFree[®] CL (Millipore, 2 mL), or equivalents from other suppliers

Procedure

1. Apply up to 3.5 mL sample to the microconcentrator, according to manufacturer's instructions.
2. Centrifuge according to manufacturer's instructions to a final volume of 200 μ L.
3. It may not always be possible to concentrate samples to 200 μ L due to the high viscosity of the sample (e.g., plasma). In these cases, centrifugation for 6 h is recommended.
4. Pipet 200 μ L concentrate into a 1.5 mL microcentrifuge tube and follow the appropriate QIAamp protocol for the specific sample.

Ordering Information

| Product | Contents | Cat. no. |
|---|--|----------|
| EZ2 RNA/miRNA Tissue/Cells Kit (48) | For 48 preps: EZ2 RNA/miRNA Tissue/Cells cartridge, Filter Tips and Holders, Tubes, RNase-free DNase, Buffer RLT, Proteinase K | 959035 |
| EZ2 Connect | Benchtop instrument for automated isolation of nucleic acids from up to 24 samples in parallel, using sealed prefilled cartridges; includes 1-year warranty on parts and labor | 9003210 |
| Accessories and reagents | | |
| Allprotect Tissue Reagent (100 mL) | For immediate stabilization of DNA, RNA, and protein in tissues | 76405 |
| RNAprotect Tissue Reagent (50 mL) | For stabilization of RNA in 25 x 200 mg tissue samples: 50 mL RNAprotect Tissue Reagent | 76104 |
| RNAprotect Tissue Reagent (250 mL) | For stabilization of RNA in 125 x 200 mg tissue samples: 250 mL RNAprotect Tissue Reagent | 76106 |
| RNAprotect Cell Reagent (250 mL) | 250 mL RNAprotect Cell Reagent | 76526 |
| Filter Tips and Holders, EZ1 (50) | 50 Disposable Filter-Tips, 50 Disposable Tip Holders; additional tips and holders for use with EZ1, EZ1&2 and EZ2 Kits | 994900 |
| QuantiTect Primer Assay (200) | Genome-wide, bioinformatically validated primer sets for use in SYBR Green-based real-time RT-PCR on any cyclor | 249900 |
| QuantiTect Reverse Transcription Kit (50) | For fast and convenient procedure for cDNA synthesis with integrated genomic DNA removal | 205311 |
| QIAshredder (50) | 50 disposable cell-lysate homogenizers for use in nucleic acid minipreps | 79654 |
| QIAshredder (250) | 250 disposable cell-lysate homogenizers for use in nucleic acid minipreps | 79656 |
| Instruments | | |
| TissueRuptor II | Handheld rotor–stator homogenizer, 5 TissueRuptor Disposable Probes | 9002755 |

| Product | Contents | Cat. no. |
|-----------------|--|----------|
| TissueLyser III | Bead mill with touch screen for simultaneous disruption of up to 192 samples | 9003240 |
| TissueLyser LT | Compact bead mill for simultaneous disruption of up to 12 samples | 85600 |

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. QIAGEN kit handbooks and user manuals are available at www.qiagen.com or can be requested from QIAGEN Technical Services or your local distributor.

Document Revision History

| Date | Changes |
|---------|--|
| 06/2023 | Added line under Ordering Info for QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit (240) (Cat. no. 51126) |
| 03/2024 | <ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="221 400 1020 448">• Added cat.no to kits, buffers accessories and enzymes. Updated references to kits. Removed one section in Appendix section.<li data-bbox="221 467 591 485">• Added Proteinase K in Kit Contents section.<li data-bbox="221 504 833 521">• Added kit compatibility with both QIAcube classic and QIAcube Connect<li data-bbox="221 541 958 558">• Added specific description on the functionality of QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit.<li data-bbox="221 577 1020 595">• Added specific description on the preinstalled protocol configurations of the QIAcube instruments. |
| 07/2025 | Corrected links of section all throughout the handbook. |

Limited License Agreement for QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit

Use of this product signifies the agreement of any purchaser or user of the product to the following terms:

1. The product may be used solely in accordance with the protocols provided with the product and this Instructions for Use and for use with components contained in the kit only. QIAGEN grants no license under any of its intellectual property to use or incorporate the enclosed components of this kit with any components not included within this kit except as described in the protocols provided with the product, this Instructions for Use, and additional protocols available at www.qiagen.com. Some of these additional protocols have been provided by QIAGEN users for QIAGEN users. These protocols have not been thoroughly tested or optimized by QIAGEN. QIAGEN neither guarantees them nor warrants that they do not infringe the rights of third-parties.
2. Other than expressly stated licenses, QIAGEN makes no warranty that this kit and/or its use(s) do not infringe the rights of third-parties.
3. This kit and its components are licensed for one-time use and may not be reused, refurbished, or resold.
4. QIAGEN specifically disclaims any other licenses, expressed or implied other than those expressly stated.
5. The purchaser and user of the kit agree not to take or permit anyone else to take any steps that could lead to or facilitate any acts prohibited above. QIAGEN may enforce the prohibitions of this Limited License Agreement in any Court, and shall recover all its investigative and Court costs, including attorney fees, in any action to enforce this Limited License Agreement or any of its intellectual property rights relating to the kit and/or its components.

For updated license terms, see www.qiagen.com.

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, FlexiGene®, Gentra®, Puregene®, InhibitEX®, MinElute®, TissueRuptor® (QIAGEN Group); Amicon®, Centricon®, UltraFree® (Merck KGaA); DACRON® (INVISTA North America S.A.R.L. Corporation); Puritan® (Puritan Medical Products Company); Triton® (Union Carbide Corp.); Tween® (ICI Americas Inc.). Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

07/2025 HB-0329-007 © 2025 QIAGEN, all rights reserved.

This page intentionally left blank

This page intentionally left blank

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 26.09.2012 № 1619-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И.Покровский
«28» сентября 2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL»

АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а



ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 3 |
| НАЗНАЧЕНИЕ | 3 |
| ПРИНЦИП МЕТОДА | 3 |
| ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ..... | 4 |
| АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ..... | 5 |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ | 5 |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ..... | 7 |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА | 9 |
| ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК..... | 10 |
| СОСТАВ | 13 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 14 |
| ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ..... | 14 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»..... | 14 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации | 14 |
| Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» | 15 |
| АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 16 |
| СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ..... | 19 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- преп» | 20 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ..... | 22 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

| | |
|--|--|
| ВКО | - внутренний контрольный образец |
| В- | - отрицательный контроль экстракции |
| К+ | - положительный контроль ПЦР |
| К- | - отрицательный контроль ПЦР |
| НК | - нуклеиновые кислоты (РНК/ДНК) |
| ПКО | - положительный контрольный образец |
| ПЦР | - полимеразная цепная реакция |
| ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора | - федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека |
| FRT | - флуоресцентная детекция в режиме «реального времени» |

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL»** предназначен для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в клещах, биологическом материале от людей (кровь, мокрота, промывные воды бронхов, ликвор, секционный материал) и материале от животных (кровь, секционный материал, плацента и абортивный материал) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.¹

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *Coxiella burnetii* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала, ПЦР-амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT). Экстракция ДНК из биологического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами проводится реакция амплификации участка ДНК *Coxiella burnetii* при помощи специфичных к этому

¹ В соответствии с директивой Европейского Союза 98/79/ЕС

участку ДНК праймеров и фермента TaqF-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствует флуоресцентно-меченый олигонуклеотидный зонд, который гибридизуется с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфических продуктов амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов. Детекция флуоресцентных сигналов при использовании формата FRT происходит непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 3 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации ДНК *Coxiella burnetii* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 2 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала и амплификацию ДНК *Coxiella burnetii* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 3 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 3 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

| Вид биологического материала (объем исследуемой пробы) | Комплект для выделения РНК/ДНК | Комплект для амплификации и детекции | Аналитическая чувствительность ² , ГЭ/мл | Пробоподготовка материала |
|---|--------------------------------|--------------------------------------|---|--|
| -клещи рода <i>Dermacentor</i> (50 мкл клещевой суспензии); -кровь (лейкоцитарная фракция крови, 200 мкл); -10 % суспензия тканей селезенки и печени (50 мкл) | «РИБО-преп» | «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F | 5x10 ³ | Данная чувствительность достигается при соблюдении нижеизложенных правил пробоподготовки биоматериала и рекомендуемом исследуемом объеме пробы |

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность изучена на бактериях *Rickettsia conorii* ssp. *Caspia*, *Ehrlichia muris* и *Francisella tularensis*, а также вирусах – вирусе Западного Нила, вирусе Крымской-Конго геморрагической лихорадки и *Herpesvirus*.

При работе с РНК/ДНК вышеперечисленных микроорганизмов, а также ДНК человека, ДНК клещей и ДНК грызунов не выявлено ложноположительных результатов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Взятие, хранение материала, транспортирование на исследование и работу с ним проводят в соответствии с инструктивно-методическими документами, регламентирующими выполнение исследований: СП 1.3. 1285-3 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», МУ 1.3.2569-09 «Организация

² Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца исследуемого материала.

работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» и СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

При работе необходимо выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как потенциально инфекционные и работать с ними в биологическом кабинете в соответствии СП 1.3. 1285-3 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)»
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3. 1285-3 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в Зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Уничтожать образцы в соответствии с СП 1.3. 1285-3 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)»

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой

и обратиться за медицинской помощью.

- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. 0,15 М NaCl (физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2) для проведения пробоподготовки клещей, тканей внутренних органов, секционного материала.
2. 96 % раствор этанола для проведения пробоподготовки клещей, обработанных маслом.
3. Глицерин для проведения пробоподготовки клещей.
4. Гомогенизатор TissueLyser LT (Qiagen, Германия) и металлические шарики из нержавеющей стали диаметром 5 мм и 7 мм рекомендуются для гомогенизации тканей органов и клещей.
5. Стерильные фарфоровая ступка и пестик для пробоподготовки внутренних органов и секционного материала.
6. Реагент «МУКОЛИЗИН» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для предварительной обработки мокроты.

ЗОНА 1. Экстракция ДНК из биологического материала.

7. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) – при работе с формой комплектации 1.
8. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
9. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
10. Автоматические дозаторы переменного объема (от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл).
11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
12. Штатив для пробирок объемом 1,5 мл.
13. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 и 1000 мкл.
14. Штативы для наконечников.

15. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс г.
16. Вортекс.
17. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости.
18. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
19. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.
20. Емкость для сброса наконечников.

ЗОНА 2. Проведение ПЦР и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации

21. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
22. Центрифуга/вортекс.
23. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 50 мкл, от 20 до 200 мкл).
24. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
25. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
26. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
27. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.
28. Емкость для сброса наконечников.
29. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
30. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Ахуген, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, США) или пробирки

для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Осуществляется в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г, а также СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

Материалом для исследования служат:

- Иксодовые клещи: *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Ixodes*.

Материал от людей:

- Цельная периферическая кровь, мокрота, промывные воды бронхов, ликвор, секционный материал (ткани мозга, сердца, легких, селезенка).

Материал от животных:

- кровь, плацента, абортивный материал, секционный материал (селезенка).

Кровь, мокроту, промывные воды бронхов, ликвор, секционный материал доставляют в лабораторию в емкости со льдом в течение 1 сут.

При поступлении в лабораторию проводят пробоподготовку крови, ликвора, промывных вод бронхов с получением бактериального осадка, после чего либо сразу приступают к экстракции нуклеиновых кислот либо замораживают пробу для длительного хранения. Клещей хранят или живыми (до 1 мес), или 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее – при температуре не выше минус 68 °С. Секционный и абортивный материал, а также плаценту хранят 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее – при температуре не выше минус 68 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

1. Клещи

Клещей предпочтительнее исследовать индивидуально. В том случае, если клещи были обработаны маслом, их следует поместить в пробирки типа «Эппендорф», добавить 500 мкл 96 % этанола и встряхнуть на вортексе. Пробирку центрифугировать в течение 3-5 с на микроцентрифуге типа вортекс для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки, после чего жидкость аккуратно отобрать с помощью вакуумного отсасывателя. Затем в пробирку с клещами добавить 500 мкл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида или PBS-буфера, встряхнуть на вортексе, центрифугировать в течение 3-5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки, после чего жидкость аккуратно отобрать с помощью вакуумного отсасывателя. Для приготовления суспензий клещей использовать стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. При наличии автоматического гомогенизатора TissueLyser LT применять следующие параметры гомогенизации: 1) для клещей родов *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis* и *Dermacentor* диаметр шариков 7 мм, частота 50 Гц/с, время гомогенизации 10–12 мин, объем буфера 700 мкл (ненапитавшийся клещ) или 1000-1500 мкл (напитавшийся клещ и пулы клещей); 2) для клещей рода *Ixodes* диаметр шариков 5 мм, частота 50 Гц/с, время гомогенизации 5–10 мин, объем буфера 300 мкл (ненапитавшийся клещ) или 700-1000 мкл (напитавшийся клещ и пулы клещей).

В случае гомогенизации напитавшихся клещей в ступке их предварительно следует проколоть стерильной одноразовой иглой в нескольких местах для выхода крови. Клещей растереть в 700 мкл (если проба состоит из одного ненапитавшегося клеща родов *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*) или в 300 мкл (если проба состоит из одного ненапитавшегося клеща рода *Ixodes*), в 1-1,5 мл (если гомогенизируют пул клещей или напитавшегося клеща родов *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*), или в 1000 мкл (если гомогенизируют пул клещей или напитавшегося клеща рода *Ixodes*) 0,15 М раствора хлорида натрия, смешивая

раствор с клещами небольшими объемами, затем полученную суспензию центрифугировать при 5 тыс об/мин в течение 2 мин и отобрать 50 мкл надосадочной жидкости для экстракции ДНК. Оставшийся объем суспензии без осадка перенести в новую пробирку типа «Эппендорф» и внести глицерин (10 % по объему), пробу перемешать и заморозить при температуре не выше минус 16 °С для последующего исследования.

2. Кровь

Взятие цельной периферической крови у людей проводится утром натощак в пробирку с 6 % раствором ЭДТА в соотношении 1:20. Закрытую пробирку несколько раз переворачивают. В пробирку типа «Эппендорф» внести 1,5 мл цельной крови, взятой с ЭДТА, и центрифугировать при 800 об/мин (380 g при диаметре ротора 50 мм) в течение 10 мин; затем верхний слой плазмы (500-600 мкл) с лейкоцитами перенести во вторую пробирку типа «Эппендорф» и центрифугировать при 9 000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (за исключением 200 мкл жидкости над осадком клеток) перенести в контейнер с дезинфицирующим раствором, а **осадок клеток и 200 мкл надосадочной жидкости** использовать для экстракции ДНК.

3. Внутренние органы, плацента и abortивный материал от животных, секционный материал, полученный от человека

Кусочки объемом не менее 0,5 см³ тщательно растереть в гомогенизаторах или с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, добавить стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида или PBS-буфер не менее 500 мкл и тщательно перемешать. При подготовке плаценты гомогенизаторы использовать не рекомендуется. Готовую 10 % суспензию отстаивать при комнатной температуре в течение 2–3 мин, затем верхнюю фазу перенести в пробирки вместимостью 1,5 мл. ДНК выделяют из **50 мкл суспензии**.

4. Мокрота

Предобработку материала выполнять по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Для экстракции ДНК использовать **50 мкл пробы**.

5. Ликвор и промывные воды бронхов

1,0 мл клинического образца перенести в пробирку типа

«Эппендорф» и центрифугировать при 9 000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (за исключением 200 мкл жидкости над осадком клеток) перенести в контейнер с дезинфицирующим раствором, а **осадок клеток и 200 мкл надосадочной жидкости** использовать для экстракции ДНК.

Материал после пробоподготовки до экстракции ДНК можно хранить при температуре не выше минус 20 °С в течение 1 мес или длительно при температуре не выше минус 68 °С.

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|--------------------------|---|------------------|---------------|
| Раствор для лизиса | Прозрачная жидкость голубого цвета ³ | 15 | 1 флакон |
| Раствор для преципитации | Прозрачная бесцветная жидкость | 20 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 3 | Прозрачная бесцветная жидкость | 25 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 4 | Прозрачная бесцветная жидкость | 10 | 1 флакон |
| РНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 4 пробирки |

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Coxiella burnetii* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|--|--------------------------------|------------------|---------------|
| ПЦР-смесь-1-FRT <i>Coxiella burnetii</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |
| ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,3 | 1 пробирка |
| Полимераза (TaqF) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Coxiella burnetii</i> / STI | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| ДНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа экстракции:

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|----------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| ВКО STI-87 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |

³ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87).

При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» порядок работы см. в **приложении 1** «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Приготовить реакционную смесь на необходимое количество реакций. При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается амплификацией как минимум

трех контрольных образцов: отрицательного контроля экстракции (В–), положительного и отрицательного контролей ПЦР (К+ и К–). Кроме того, необходимо брать реагенты с **запасом**: рассчитывать на одну реакцию больше.

2. В отдельной пробирке необходимо смешать **ПЦР-смесь-1-FRT *Coxiella burnetii*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF)** из расчета на каждую реакцию:
 - **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *Coxiella burnetii*;**
 - **5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT;**
 - **0,5 мкл полимеразы (TaqF).**
3. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.
4. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь не хранить!

5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Осторожно перемешать пипетированием.
6. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера.**
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Coxiella burnetii* / STI.**
 - в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из (В–).

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси с пробами ДНК и контролями!

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Таблица 1

| Цикл | Приборы роторного типа ⁴ | | | Приборы планшетного типа ⁵ | | |
|------|-------------------------------------|--|---------------|---------------------------------------|--|---------------|
| | Температура | Время | Кол-во циклов | Температура | Время | Кол-во циклов |
| 1 | 95 °С | 15 мин | 1 | 95 °С | 15 мин | 1 |
| 2 | 95 °С | 5 с | 5 | 95 °С | 5 с | 5 |
| | 60 °С | 20 с | | 60 °С | 25 с | |
| | 72 °С | 15 с | | 72 °С | 15 с | |
| 3 | 95 °С | 5 с | 40 | 95 °С | 5 с | 40 |
| | 56 °С | 20 с детекция флуоресц. Сигнала | | 56 °С | 25 с детекция флуоресц. Сигнала | |
| | 72 °С | 15 с | | 72 °С | 15 с | |

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM и JOE.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. **Лунка №1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой.**
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВКО STI-87,
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Coxiella burnetii*.

⁴ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁵ Например, iCycler iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96» и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла Ct в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК *Coxiella burnetii* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла Ct , не превышающее указанное (граничное) значение. При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК *Coxiella burnetii* **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла Ct , не превышающее указанное (граничное) значение, а по каналу JOE не определено значение порогового цикла Ct .
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct по каналу JOE и по каналу FAM значение Ct также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК

В соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 2).

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Значение порогового цикла, <i>Ct</i> | |
|----------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | | по каналу для флуорофора JOE | по каналу для флуорофора FAM |
| В– | Экстракция ДНК | Значение отсутствует | Определено значение меньше граничного |
| К– | ПЦР | Значение отсутствует | Значение отсутствует |
| К+ | ПЦР | Определено значение меньше граничного | Определено значение меньше граничного |

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Coxiella burnetii*.
3. Если для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам FAM и/или JOE определено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Coxiella burnetii*, с постановкой «К–» не менее чем в трех повторах.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-преп» и «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *Coxiella burnetii*, полимеразу (TaqF) и ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT (из комплекта реагентов «ПЦР-комплект») хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *Coxiella burnetii* хранить в защищенном от света месте.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «**АмплиСенс**[®] *Coxiella burnetii*-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)⁶.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач Областной инфекционной
клинической больницы им.А.М.Ничоги



А.В.Буркин

г.Астрахань

⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»

Экстракция ДНК из всех видов биологического материала проводится с применением комплекта реагентов «РИБО-преп»

Порядок работы.

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. **В случае экстракции ДНК из суспензий клещей и тканей, мокроты** отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку, предназначенную для экстракции исследуемых проб, по **10 мкл ВКО STI-87** и по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
2. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-87** внести по **50 мкл** суспензий клещей, суспензий тканей и обработанной муколизином мокроты.
3. **В случае экстракции ДНК из осадков клеток крови, ликвора, промывных вод бронхов** в пробирки с пробоподготовленным материалом внести по **300 мкл раствора для лизиса**. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и процентрифугировать на вортексе для удаления капель с крышки пробирки. В пробирки с исследуемыми пробами внести по **10 мкл ВКО STI-87**. Промаркировать пробирки.
4. В пробирку отрицательного контроля (В–) экстракции внести **только 10 мкл ВКО STI-87** и **300 мкл раствора для лизиса**.
5. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 10 000 g**.
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
9. Центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
12. Центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
16. Центрифугировать пробирки при **10 000 g** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР. Очищенная ДНК может храниться до 24 ч при температуре от 2 до 8 °C и до года при температуре не выше минус 16 °C.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации



Код партии



Максимальное
число тестов



Изделие для in vitro
диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Ограничение
температуры



Не допускать
попадания
солнечного света



Верхнее ограничение
температуры



Дата
изготовления



Производитель



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 13 марта 2019 года № ФСР 2012/13923

На медицинское изделие

Набора реагентов для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL" по ТУ 9398-195-01897593-2011

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Производитель

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Место производства медицинского изделия

см. приложение

Номер регистрационного досье № РД-26105/11178 от 28.02.2019

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 3

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности 21.20.23.110

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 13 марта 2019 года № 1968
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

**Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения**

Д.Ю. Павлюков



0042596

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 13 марта 2019 года № ФСР 2012/13923

Лист 1

На медицинское изделие

Набора реагентов для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL" по ТУ 9398-195-01897593-2011:

Формат FRT.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 3 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.



Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения


Д.Ю. Павлюков
0054114

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от 09.04.08 № 2617-Пп/08

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека


В.И.Покровский
«20» декабря 2007 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Bacillus anthracis* в биологическом
материале и объектах окружающей среды методом
полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-
флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»
«АмплиСенс® *Bacillus anthracis*-FRT»

Набор реагентов состоит из 2 комплектов реагентов:

- «ДНК-сорб-В» вариант 50 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала;
- «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Bacillus anthracis* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Допускается комплектация без комплекта реагентов «ДНК-сорб-В».

ФОРМА ВЫПУСКА.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50 включает:

| Реактив | Описание | Объем (мл) | Кол-во |
|-------------------------|--------------------------------|------------|------------|
| Лизирующий раствор | Прозрачная бесцветная жидкость | 15 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 1 | Прозрачная бесцветная жидкость | 15 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 2 | Прозрачная бесцветная жидкость | 50 | 1 флакон |
| Сорбент универсальный | Суспензия белого цвета | 1,25 | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер для элюции ДНК | Прозрачная бесцветная жидкость | 5,0 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT включает:

| Реактив | Описание | Объем (мл) | Кол-во |
|---|---|------------|-------------|
| ПЦР-смесь-1-FRT <i>Bacillus anthracis</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,008 | 55 пробирок |
| ПЦР-смесь-2-FL | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,77 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Bacillus anthracis</i> рХО1 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Bacillus anthracis</i> рХО2 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ПКО STI | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ОКО | Прозрачная жидкость от соломенно-желтого до бесцветного | 1,6 | 1 пробирка |
| ВКО STI-704 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |
| ДНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов «АмплиСенс® *Bacillus anthracis*-FRT» предназначен для выявления ДНК вегетативных и споровых форм *Bacillus anthracis* в биологическом материале и объектах окружающей среды, а также для определения плазмидного состава *Bacillus anthracis* путем выявления гена *pagA* (плазмида рХО1) и гена *capA* (плазмида рХО2) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Один набор рассчитан на 50 тестов, включая контрольные образцы.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

Взятие, транспортирование, хранение материала на исследование и работу с ним проводят в соответствии с инструктивно-методическими документами, регламентирующими выполнение исследований: СП 1.3. 1285-3 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», МУ 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности» и СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ МАТЕРИАЛА НА ИССЛЕДОВАНИЕ.

Для проведения анализа используются следующие материалы:

- Вода (сточная, из водоема, питьевая) – 10-20 мл.
- Почва.
- Смывы с воздушных фильтров.
- Порошкообразные вещества (корма для крупного рогатого скота (КРС), мука и т.д.)

Материал от людей:

- Цельная кровь – 5 мл. Забор крови проводится утром натощак в пробирку типа Vacuette®, с 6 % раствором ЭДТА из расчета 50 мкл ЭДТА на 1 мл крови. Закрытую пробирку с кровью несколько раз тщательно перемешивают путем

переворачивания.

- Экссудат из очагов поражения (при кожной форме), помещенный в 200 мкл стерильного раствора натрия хлорида 0,9 % (используют без предварительной обработки).
- Мокрота – в емкость с мокротой, для ее разжижения, добавляют коммерческий реагент «Муколизин» производства ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Предобработка мокроты проводится по инструкции к реагенту «Муколизин». При необходимости повторного проведения анализа остаток обработанной мокроты замораживают.

Материал от животных:

- Цельная кровь – 5 мл. Забор крови проводят в пробирку типа Vacuette[®], с 6 % раствором ЭДТА из расчета 50 мкл ЭДТА на 1 мл крови. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают, чтобы перемешать консервант.
- Молоко КРС – без предварительной обработки.
- Паренхиматозные органы и лимфоузлы.

Биологический материал доставляют в лабораторию в емкости со льдом в течение 1 сут.

Допускается хранение вышеперечисленного материала до проведения исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С и в течение 6 мес при температуре не выше минус 16 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Предварительная обработка материала:

Вода и смывы с воздушных фильтров.

10-20 мл воды центрифугировать 15 мин на центрифуге при 8000 g (10 000 об/мин при радиусе ротора 70 мм или 3 000 об/мин при радиусе ротора 150 мм). Надосадочную жидкость следует осторожно удалить, оставив 100 мкл. Осадок ресуспендировать в объеме 100 мкл и перенести в пробирки на 1,5 мл.

Почва:

В пробирки объемом 5 мл с плотно закрывающейся (завинчивающейся) крышкой отдельным шпателем (или одноразовыми лопатками) внести по 0,4-1,0 г (около 1,0 мл)

земли, залить 3 мл раствора натрия хлорида 0,9 %, тщательно перемешать и отстаивать 5 мин. Из пробирок с отстоявшейся землей перенести 1 мл раствора в пробирки объемом 1,5 мл с плотно закрывающейся крышкой и осадить грубодисперсную фракцию центрифугированием на микроцентрифуге 2-3 мин при 300 g (2000 об/мин при радиусе ротора 70 мм). Далее использовать осветленную надосадочную жидкость.

Порошкообразные вещества.

Порошкообразные вещества (объем около 0,05 см³) растворить в 150 мкл стерильного раствора натрия хлорида 0,9 % и использовать полученный раствор в работе.

Нерастворимые в воде вещества следует обрабатывать аналогично пробам земли.

Паренхиматозные органы.

Кусочки размером не менее 1 см³ и лимфоузлы (целиком) тщательно растереть в гомогенизаторах или с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, добавить равный объем (не менее 100 мкл) стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешать. Суспензию отстаивать при комнатной температуре в течение 2-3 мин, затем верхнюю фазу перенести в пробирки вместимостью 1,5 мл и использовать далее на стадии обеззараживания.

Обеззараживание материала:

Проводят согласно МУ 3.5.5.1034-01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I-IV групп патогенности, при работе методом ПЦР».

1. Герминация спор.

Предварительно подготовленный исследуемый материал в количестве 0,1 мл мерной пипеткой емкостью 1-2 мл 2 класса точности засеять в пробирки (ГОСТ 1770-74) с 0,9 мл бульона Хоттингера pH 7,2±0,1 и инкубировать с интенсивной аэрацией на шуттель-аппарате при температуре (37±1) °C в течение 2,5 ч.

2. Обработка пенициллином.

В пробирки добавить свежеприготовленный раствор пенициллина (до конечной концентрации 1000 ед/мл) и

инкубировать еще 15 мин при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$.

3. 1 мл суспензии перенести автоматической пипеткой с наконечниками с аэрозольным барьером в пробирки объемом 1,5 мл (с застегивающимися или завинчивающимися крышками, снабженными резиновыми прокладками) и подвергнуть центрифугированию при 12 тыс об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отобрать, к осадку добавить 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида, ресуспендировать. Пробирки прогреть в твердотельном термостате при температуре $(110\pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 10 мин.
4. Лизирующий раствор из комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов. В каждую пробирку с исследуемыми пробами внести по 300 мкл лизирующего раствора и инкубировать в течение 15 мин при температуре 65 °С.

Дальнейшие исследования проб проводить как с обеззараженным материалом по порядку процедур, описанных в разделе «ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК».

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.

(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

ЗОНА 1.

**Для выделения ДНК из исследуемого материала
требуются:**

1. Стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
5. Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или

плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).

8. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
9. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
10. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.
14. Комплект средств для обработки рабочего места.

ЗОНА 2.

Для проведения ПЦР-амплификации и детекции продуктов амплификации требуются:

1. Амплификатор «Rotor-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) или эквивалентный.
2. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
3. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
4. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
5. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
6. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
7. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
8. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
9. Емкость с дезинфицирующим раствором.
10. Комплект средств для обработки рабочего места.

ПРИМЕЧАНИЕ: допускается применение оборудования другого типа, по своим характеристикам не уступающего рекомендуемому.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

(Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50).
(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала).

Порядок работы.

1. Подготовить **отрицательный контроль выделения ДНК (ОК)**. В пробирку объемом 1,5 мл внести **300 мкл лизирующего раствора** и **100 мкл ОКО** – отрицательного контрольного образца.
2. Отдельными наконечниками с аэрозольным барьером внести в каждую пробирку с пробами (см. раздел «Обеззараживание биологического материала»), включая **ОК**, по **10 мкл ВКО STI-704**.
3. Пробы тщательно перемешать на вортексе, прогреть 5 мин при температуре 65 °С, осадить на вортексе 5 с. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), то необходимо центрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) и использовать для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенести ее в новую пробирку.
4. Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 5 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.
5. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
6. Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировать 30 с при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) на

микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. При работе с образцами крови допустимо применение дозатора с индивидуальным наконечником с аэрозольным барьером для механического разбивания осадка.

7. Добавить в пробы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Повторить отмывку еще раз, следуя п. 7, удалить надосадочную жидкость полностью.
9. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
10. В пробирки добавить по **50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
11. Процентрифугировать пробирки при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Допускается хранение очищенной ДНК в течение 7 сут при температуре от 2 до 8 °С и в течение года при температуре не выше минус 16 °С.

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ (Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT).

(проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения ПЦР-амплификации).

Общий объем реакции – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-

полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при температуре 95 °С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

Порядок работы:

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FRT *Bacillus anthracis*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб (1 – отрицательная и 3 – положительные контрольные пробы).
2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FRT *Bacillus anthracis***.

Б. Проведение амплификации.

1. В подготовленные для ПЦР пробирки внести отдельными наконечниками с аэрозольным барьером по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК.
2. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
 - а) **отрицательный контроль (К-)** – внести в подготовленную пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль (К1+)** – внести в подготовленную пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Bacillus anthracis* рХО1**.
 - в) **положительный контроль (К2+)** – внести в подготовленную пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Bacillus anthracis* рХО2**.
 - г) **положительный контроль (ВК+)** – внести в подготовленную пробирку **10 мкл ПКО ST1**.

В. Программирование амплификатора:

Для работы с прибором «Rotor-Gene» 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с прибором «Rotor-Gene» 6000- программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора «Rotor-Gene» 3000 / для англоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 / для

русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000.

1. Нажать кнопку «New»/«Новый» в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать меню «Advanced»/«Детальный мастер» и шаблон запуска эксперимента «Dual Labeled Probe»/«Hydrolysis probes»/«Флуоресцентные зонды (TaqMan)». Нажать кнопку «New»/«Новый».
3. Выбрать тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Поставить отметку в окне рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено».
4. Нажать кнопку «Next»/«Далее».
5. Выбрать объем реакционной смеси: Reaction volume/Объем реакции -25 мкл. Для прибора «Rotor-Gene» 6000 должно быть активно (отмечено галочкой) окно «15 µl oil layer volume»/«15 µL объем масла/воска». (Если галочка не стоит в окне по умолчанию, поставить ее с помощью мышки).
6. Нажать кнопку «Next»/«Далее».
7. В верхней части окна нажать кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля».
8. Задать следующие параметры эксперимента:
 1. «Hold»/«Удерж. темп-ры» 95 °C – 5 мин
 2. «Cycling»/«Циклирование» 95 °C – 10 с
60 °C – 25 с
72 °C – 10 с
Cycle repeats/Цикл повторить – 10 times/раз.
 3. «Cycling 2»/«Циклирование 2» 95 °C – 10 с
56 °C – 25 с – Детекция
72 °C – 10 с
Cycle repeats/Цикл повторить – 35 times/раз.
 4. Флуоресценцию измеряют при температуре **56 °C** (во втором блоке циклирования) на каналах **FAM/Green, JOE/Yellow и ROX/Orange**.
 5. Нажать дважды кнопку «OK»/«Да».
9. В нижней части окна нажать кнопку «Calibrate»/«Gain Optimisation...»/«Опт. уровня сигн.». В открывшемся окне нажать кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/«Опт. Детек-мых». Для канала FAM/Green установить параметры «Min Reading»/«Миним Сигнал» –

20FI и «**Max Reading**»/«**Максим Сигнал**» – 30FI. Для канала JOE/Yellow установить параметры «**Min Reading**»/«**Миним Сигнал**» – 10FI и «**Max Reading**»/«**Максим Сигнал**» – 15FI. Для канала ROX/Orange установить параметры «**Min Reading**»/«**Миним Сигнал**» – 5FI и «**Max Reading**»/«**Максим Сигнал**» – 10FI. В графе «Tube position»/«Позиция Пробирки» указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «gain»/«усиление сигнала», по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью. Поставить галочкой бокс в строке «Perform Calibration Before 1st Acquisition»/«Perform Optimisation Before 1st Acquisition»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Окно закрыть, нажав кнопку «**Close**»/«**Заккрыть**». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».

10. Поместить предварительно подготовленные пробирки в амплификатор. Запустить амплификацию кнопкой «**Start run**»/«**Старт**».

11. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку «**Edit samples**»/«**Правка образцов**» (в нижней правой части основного окна). Все пробы и контроли обозначить в меню «**Samples**»/«**Образцы как Unknown**»/«**Образец**».

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Анализ результатов амплификации ВКО по каналу ROX/Orange.

1. Нажать в меню кнопку «**Analysis**»/«**Анализ**», выбрать режим анализа «**Quantitation**»/«**Количественный**», нажать кнопку «**Cycling A. ROX**»/«**Cycling A. Orange**», «**Show**»/«**Показать**».
2. Отменить автоматический выбор «**Threshold**»/«**Порог**».
3. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку «**Linear scale**»/«**Линейная Шкала**» в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки «**Linear scale**»/

- «Линейная Шкала» видна кнопка «Log scale»/ «Лог. Шкала»).
4. В меню основного окна («Quantitation analysis»/«Количественный анализ») должна быть нажата кнопка «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
 5. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0.1.
 6. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct, которые должны быть не более 31 для исследуемых образцов и контролей.

Анализ результатов амплификации ДНК *Bacillus anthracis* pXO1 по каналу FAM/Green.

1. Нажать в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку «Cycling A. FAM»/«Cycling A. Green», «Show»/«Показать».
2. Отменить автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
3. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку «**Linear scale**»/«**Линейная Шкала**» в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки «Linear scale»/«Линейная Шкала» видна кнопка «Log scale»/ «Лог. Шкала»).
4. В меню основного окна («Quantitation analysis»/«Количественный анализ») должна быть нажата кнопка «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
5. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» выставить «Threshold»/«Порог» = 0.025.
6. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct.

Анализ результатов амплификации ДНК *Bacillus anthracis* pXO2 по каналу JOE/Yellow.

1. Нажать в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку «Cycling A. JOE»/«Cycling A. Yellow», «Show»/«Показать».
2. Отменить автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
3. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку «**Linear scale**»/«**Линейная**

Шкала» в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки «Linear scale»/«Линейная Шкала» видна кнопка «Log scale»/ «Лог. Шкала»).

4. В меню основного окна («Quantitation analysis»/«Количественный анализ») должна быть нажата кнопка «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
5. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» выставить «Threshold»/«Порог» = 0.1.
6. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК (см. табл. 1).

Таблица 1.

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-анализа | Значение Ct по каналу | | |
|----------|---------------------------------|-----------------------|--------------|--------------|
| | | FAM/Green | JOE/Yellow | ROX/Orange |
| «OK» | Выделение ДНК | Нет значений | Нет значений | < 31 |
| «К-» | ПЦР | Нет значений | Нет значений | Нет значений |
| «К1+» | ПЦР | < 33 | Нет значений | Нет значений |
| «К2+» | ПЦР | Нет значений | < 33 | Нет значений |
| «ВК+» | ПЦР | Нет значений | Нет значений | < 31 |

1. **Образец считают положительным на наличие ДНК *Bacillus anthracis* pXO1+ и pXO2+, если значение Ct по каналу FAM/Green и JOE/Yellow менее 33, не зависимо от значения Ct по каналу ROX/Orange.**
2. **Образец считают положительным на наличие ДНК *Bacillus anthracis* pXO1+, если значение Ct по каналу**

FAM/Green менее 33, не зависимо от значения Ct по каналу ROX/Orange.

3. **Образец считают положительным на наличие ДНК *Bacillus anthracis* pXO2+,** если значение Ct по каналу JOE/Yellow менее 33, не зависимо от значения Ct по каналу ROX/Orange.
4. **Образец считают отрицательным,** если по каналам FAM/Green и JOE/Yellow для него значение Ct отсутствует, а по каналу ROX/Orange для него определено значение Ct, не превышающее 31.

Таблица 2.

Оценка результатов исследуемых проб

| | Значение Ct по каналу | | | Результат анализа |
|---|-----------------------|------------|-------------------|---|
| | FAM/Green | JOE/Yellow | ROX/Orange | |
| 1 | Нет | Нет | ≤ 31 | <i>Bacillus anthracis</i> не обнаружена |
| 2 | < 33 | Нет | ≤ 31 (или Нет) | <i>Bacillus anthracis</i> (pXO1+/pXO2-) |
| 3 | < 33 | < 33 | ≤ 31 (или Нет) | <i>Bacillus anthracis</i> (pXO1+/pXO2+) |
| 4 | Нет | <33 | ≤ 31 (или Нет) | <i>Bacillus anthracis</i> (pXO1-/pXO2+) |
| 5 | Нет | Нет | Нет (или > 31) | Проба подлежит повторному анализу с этапа выделения ДНК |

Результаты не подлежат учету:

1. Отсутствие положительного сигнала в пробах с положительными контролями ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз.
2. Если значение Ct по каналу FAM/Green больше 33, а значение Ct по каналу ROX/Orange не превышает 31, требуется повторить ПЦР и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения Ct на канале FAM/Green менее 33.
3. Если значение Ct на канале JOE/Yellow больше 33, а значение Ct по каналу ROX/Orange не превышает 31, требуется повторить ПЦР и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения Ct на канале JOE/Yellow менее 33.
4. Если в образце отсутствует значение Ct по каналам

FAM/Green и JOE/Yellow, а значение Ct по каналу ROX/Orange более 31 или отсутствует, требуется повторное проведение ПЦР и детекции. В случае если повторно получен аналогичный результат, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа выделения нуклеиновых кислот.

5. Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контрольного образца на канале JOE/Yellow и/или FAM/Green и для отрицательного контроля ПЦР (ДНК-буфер) на любом из каналов свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить на каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности 6 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Bacillus anthracis-FRT*» направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (495) 241-39-22, факс (495) 241-92-38), в адрес предприятий-изготовителей: ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 305-39-39, факс (495) 305-54-23), ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (410005. г. Саратов, ул. Университетская, д.46, тел (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12) и в адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 105-0554, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Директор ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии»
Роспотребнадзора



В.И. Покровский

Директор ФГУЗ Российского научно-исследовательского
противочумного института «Микроб»
Роспотребнадзора



В.В. Кутырев

Руководитель приемочных технических
и медицинских испытаний
Зав. лабораторией препаратов против чумы
и других особо опасных инфекций
ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора

Л.В.Саяпина



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 13 марта 2019 года № ФСР 2008/02417

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления ДНК *Bacillus anthracis* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме "реального времени" "АмплиСенс® *Bacillus anthracis*-FRT" по ТУ 9398-001-01897593-2007

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Производитель

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Место производства медицинского изделия

см. приложение

Номер регистрационного досье № РД-26121/11203 от 01.03.2019

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 3

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности **21.20.23.110**

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 13 марта 2019 года № 1983-19-03
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения



Д.Ю. Павлюков

0042652

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 13 марта 2019 года

№ ФСР 2008/02417

Лист 1

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления ДНК *Bacillus anthracis* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме "реального времени" "АмплиСенс® *Bacillus anthracis*-FRT" по ТУ 9398-001-01897593-2007:

Формат FRT.

Форма 1 включает комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, "ПЦР-комплект" вариант FRT;

Форма 2 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 11123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 11123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.

Z

Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения



Д.Ю. Павлюков
0054568



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 05 марта 2019 года № ФСР 2011/11503

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления РНК вируса Западного Нила в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс[®] WNV-FL" по ТУ 9398-162-01897593-2012

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Производитель

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Место производства медицинского изделия

см. приложение

Номер регистрационного досье № РД-25976/9608 от 21.02.2019

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 26

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности 21.20.23.110

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 05 марта 2019 года № 1777
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

**Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения**



Д.Ю. Павлюков

0042534

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 05 марта 2019 года

№ ФСР 2011/11503

Лист 1

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления РНК вируса Западного Нила в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® WNV-FL" по ТУ 9398-162-01897593-2012:

Формат FRT в 6 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 3 включает комплекты реагентов для комбинированного метода выделения РНК: «РИБО-преп» вариант 50, «РИБО-золь-С» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 4 включает комплекты реагентов для комбинированного метода выделения РНК: «РИБО-сорб» вариант 50, «РИБО-золь-С» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 5 включает 1 комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000, 2 комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 6 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.

2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.



**Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения**

Д.Ю. Павлюков
0054058

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от 04.05.2012 № 2084-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека


В.И.Покровский
«5» апреля 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК вируса Западного Нила
в биологическом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® WNV-FL»

АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 3 |
| НАЗНАЧЕНИЕ | 3 |
| ПРИНЦИП МЕТОДА | 3 |
| ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ..... | 4 |
| АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ..... | 5 |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ | 6 |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ..... | 7 |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА | 9 |
| ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК | 9 |
| ФОРМАТ FRT | 13 |
| СОСТАВ | 13 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 15 |
| ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ..... | 16 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИИ кДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» | 16 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации | 16 |
| Б. Проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с детекцией в режиме «реального времени» | 18 |
| АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ | 18 |
| СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ..... | 22 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, СМЖ, лейкоцитарной фракции крови, мочи (без осадка солей), гомогенатов тканей внутренних органов и комаров с применением комплекта реагентов «РИБО-преп» . | 23 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция РНК из лейкоцитарной фракции крови, осадков мочи, суспензий тканей внутренних органов, комаров и клещей с применением комплектов реагентов «РИБО-золь-С» и «РИБО-преп» | 25 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция РНК из лейкоцитарной фракции крови, осадков мочи, суспензий тканей внутренних органов, комаров и клещей с применением комплектов реагентов «РИБО-золь-С» и «РИБО-сорб» | 28 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ..... | 31 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

| | |
|--|---|
| ВКО | - внутренний контрольный образец |
| К- | - отрицательный контроль ПЦР |
| К+ | - положительный контроль ПЦР |
| кДНК | - комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК |
| НК | - нуклеиновые кислоты (РНК/ДНК) |
| ОКО | - отрицательный контрольный образец |
| ОК | - отрицательный контрольный образец экстракции РНК |
| ПК | -положительный контроль экстракции РНК |
| ПКО | - положительный контрольный образец |
| ПЦР | - полимеразная цепная реакция |
| СМЖ | - спинномозговая жидкость |
| ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора | - федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека |
| FRT | - флуоресцентная детекция в режиме «реального времени» |
| WNV | - <i>West Nile virus</i> , вирус Западного Нила |

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *WNV-FL*» предназначен для выявления РНК вируса Западного Нила (*WNV*) в клиническом (плазма и сыворотка крови, лейкоцитарная фракция крови, спинномозговая жидкость, моча) и аутопсийном материале от людей (ткани мозга, печени, селезенки, лимфоузлов), материале от животных (ткани мозга), в комарах и клещах методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *WNV* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя следующие этапы: экстракцию РНК из образцов клинического материала, проведение обратной транскрипции РНК и амплификацию участка кДНК *WNV* с гибридационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР.

Экстракция РНК из клинического материала проводится в

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-гес), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами проводятся: обратная транскрипции РНК с помощью фермента ТМ-Ревертазы и амплификация участков кДНК *WNV* при помощи специфичных к этому участку кДНК праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствует флуоресцентно-меченый олигонуклеотидный зонд, который гибридизуется с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфических продуктов амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов. Детекция флуоресцентных сигналов при использовании формата FRT происходит непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 6 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 3 включает комплекты реагентов для комбинированного метода экстракции РНК: «РИБО-преп» вариант 50, «РИБО-золь-С» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 4 включает комплекты реагентов для комбинированного метода экстракции РНК: «РИБО-сорб» вариант 50, «РИБО-золь-С» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 5 включает 1 комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000, 2 комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 6 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо дополнительно использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в зависимости от вида исследуемого материала.

Формы комплектации 2, 3, 4, 5 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включая экстракцию РНК из клинического материала, проведение обратной транскрипции РНК и амплификацию кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 6 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 6 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

| Вид биологического материала (объем исследуемой пробы) | Комплект для экстракции РНК/ДНК | Комплект для амплификации и детекции | Аналитическая чувствительность, копий/мл | Пробоподготовка материала |
|---|---------------------------------|--------------------------------------|--|--|
| сыворотка крови (200 мкл), СМЖ (200 мкл), лейкоцитарная фракция крови (200 мкл), 10 % суспензия тканей мозга (30 мкл), комары (100 мкл) | «РИБО-преп» | «ПЦР-комплект» вариант FRT | 5×10^3 | Данная чувствительность достигается при соблюдении нижеизложенных правил пробоподготовки биоматериала и рекомендуемом исследуемом объеме пробы |
| лейкоцитарная фракция крови (200 мкл), 10 % суспензия тканей мозга (30 мкл), комары (100 мкл) | «РИБО-преп» и «РИБО-золь-С» | «ПЦР-комплект» вариант FRT | 5×10^3 | |
| лейкоцитарная фракция крови (200 мкл), 10 % суспензия тканей мозга (30 мкл), комары (100 мкл) | «РИБО-сорб» и «РИБО-золь-С» | «ПЦР-комплект» вариант FRT | 5×10^3 | |
| Сыворотка и плазма крови, СМЖ – 1 мл | «МАГНО-сорб» | «ПЦР-комплект» вариант FRT | 5×10^2 | |

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность изучена на:

- флавивирусах (вирус клещевого энцефалита, Лангат, Повассан, Японского энцефалита, Омской геморрагической лихорадки);
- герпесвирусах (I и II типов, CMV, EBV, VZV, IV типа), энтеровирусах (ECHO, Coxsackie);
- риккетсиях группы пятнистых лихорадок (*Rickettsia conorii* ssp. *caspia*, *R.heilongjiangensis*; *Coxiella burnetii*; *Bartonella henselae*, *B.quintana*);
- спирохетах (*Borrelia miyamotoi*; *Treponema pallidum*; *Leptospira interrogans*, *L.kirshneri*, *L.borgpetersenii*).

При работе с РНК/ДНК вышеперечисленных организмов, ДНК человека, ДНК птиц, ДНК клещей и комаров, ДНК грызунов не выявлено ложноположительных результатов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

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

ВНИМАНИЕ! При работе с клещом с высокой степенью питанности рекомендуется перед гомогенизацией проколоть его одноразовой иглой для выхода крови и предупреждения разбрызгивания материала при растирании в ступке.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с

микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. 0,15 М NaCl или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2).
2. Комплекты реагентов для выделения РНК/ДНК (в зависимости от типа исследуемого биоматериала) при работе с формой комплектации 1.
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК/ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК.

4. Гомогенизатор TissueLyser LT (Qiagen, Германия) рекомендуется использовать для гомогенизации аутопсийного материала, клещей и комаров.
5. Металлические шарики из нержавеющей стали диаметром 5 мм и 7 мм.
6. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
7. Центрифуга/вортекс.
8. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
9. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах, до 200 мкл и до 1000 мкл.
10. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
12. Штативы для наконечников и пробирок объемом 1,5 мл.
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб РНК.
14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
15. Емкость для сброса наконечников.
16. Емкость с дезинфицирующим раствором.
17. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
18. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Ахуген, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, США) – при использовании прибора роторного типа.

При использовании комплекта реагентов «МАГНО-сорб» дополнительно:

1. Термостат для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм от 25 до 100 °С.
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
3. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл.
4. Магнитный штатив для пробирок на 5 мл, диаметр 12 мм.
5. Одноразовые полипропиленовые или полистирольные пробирки объемом до 5 мл диаметром 12 мм, круглодонные.
6. Одноразовые полипропиленовые крышки для пробирок объемом до 5 мл диаметром 12 мм.
7. Автоматический дозатор переменного объема с возможностью дозирования от 1000 до 5000 мкл.
8. Одноразовые наконечники до 200 мкл, до 1000 мкл и до 5000 мкл.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

1. Плазма крови, сыворотка крови, СМЖ. Взятие цельной периферической крови проводится утром натощак в пробирку с 6 % раствором ЭДТА из расчета 1:20. Закрытую пробирку с цельной периферической кровью несколько раз переворачивают. Для отбора плазмы пробирку с кровью центрифугируют в течение 20 мин при 1600 g. Сыворотку крови получают стандартными методами. СМЖ не проходит стадию пробоподготовки. Для исследования отбирают 200 мкл клинического материала при экстракции РНК с использованием комплекта «РИБО-преп» или 1 мл клинического материала при использовании комплекта «МАГНО-сорб».
2. Лейкоцитарная фракция крови. Для исследования

лейкоцитарной фракции крови (данный тип клинического материала рекомендуется для исследования на 2-й нед заболевания) 1,5 мл крови с раствором ЭДТА переносят в пробирку типа «Эппендорф» и центрифугируют на микроцентрифуге при 400 g в течение 10 мин. Затем отбирают приблизительно 500-600 мкл плазмы и центрифугируют при 7000 g в течение 10 мин. После чего оставляют для экстракции РНК осадок клеток и 200 мкл надосадочной плазмы над клетками при экстракции с использованием комплекта «РИБО-преп» и при использовании комбинированных методов экстракции (комплекты «РИБО-золь-С» и «РИБО-сорб» или комплекты «РИБО-золь-С» и «РИБО-преп»).

3. Внутренние органы животных и секционный материал.

Данный материал гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. При наличии автоматического гомогенизатора TissueLyser LT применяют следующие параметры для гомогенизации тканей внутренних органов: объем PBS-буфера или 0,15 М раствора NaCl для гомогенизации определяется объемом гомогенизируемой ткани – соотношение ткань-буфер определяется как 1:9, то есть готовится 10 % суспензия. Общий объем пробы для пробирок объемом 1,5 мл не должен превышать 1 мл, условия гомогенизации: для тканей мозга: диаметр шариков – 5 мм; частота – 50 Гц/сек; время гомогенизации – 2-3 минуты; для тканей печени, селезенки, лимфоузлов: диаметр шариков – 7 мм; частота – 50 Гц/сек; время гомогенизации – 10 минут; для лимфоузлов: диаметр шариков – 5 мм; частота – 50 Гц/сек; время гомогенизации – 5 минут.

Для экстракции РНК берут 30 мкл суспензии в случае экстракции комплектом «РИБО-преп» и комбинированным методом (комплекты «РИБО-золь-С» и «РИБО-сорб») и 100 мкл суспензии в случае экстракции комбинированным методом (комплекты «РИБО-золь-С» и «РИБО-преп»).

4. Моча. Для исследования моча собирается в чистую посуду. Если нет возможности исследовать материал в течение

1 суток после взятия, моча переносится в центрифужную пробирку на 30 мл или пробирку типа «Эппендорф», затем в нее вносят глицерин, 10 % от объема пробы, перемешивают для равномерного распределения глицерина и замораживают при минус 20 °С для хранения в течение 1 нед или при минус 70 °С в течение более длительного времени.

При наличии центрифуги с охлаждением до 4 °С для пробирок объемом 30 мл и ускорением 8000 g используется следующий алгоритм пробоподготовки. Пробу центрифугируют при 8000-9000 g в течение 10 мин, затем надосадочную жидкость переносят в емкость с дезинфицирующим раствором, а осадок и 1 мл надосадочной жидкости над ним – в пробирку типа «Эппендорф». После чего снова концентрируют пробу при 8000 g в течение 10 мин. 900 мкл надосадочной жидкости переносят в емкость с дезинфицирующим раствором, а осадок и 100 мкл надосадочной жидкости используют для экстракции РНК. В случае наличия большого количества солей, для экстракции РНК в отдельную пробирку типа «Эппендорф» переносят 100 мкл надосадочной жидкости.

При отсутствии центрифуги для пробирок объемом 30 мл и ускорением 8000 g, проводят концентрирование бактерий только из 1 мл мочи как описано выше. Экстракцию РНК также проводят из осадка и 100 мкл надосадочной жидкости.

5. Комары. Для приготовления суспензий комаров используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. При наличии автоматического гомогенизатора TissueLyser LT применяют следующие параметры для гомогенизации комаров (диаметр шариков – 5 мм; частота – 50 Гц/с; время гомогенизации – 5 мин; объем буфера – 700 мкл (пул из 25 комаров), 1000-1500 мкл (пул из 50 комаров). Предварительно формируют пулы комаров (не более 50 особей). Комаров гомогенизируют в стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере из расчета 1 комар – 30 мкл раствора. Центрифугируют пробы при 10 000 g в течение 1 мин. Затем отбирают 100 мкл надосадочной жидкости для экстракции РНК.
6. Клещи. Предварительно формируют пулы клещей: голодных объединяют по 5-7 особей, полунапитавшихся – по 2-3;

полностью напитавшихся – по 1. Для приготовления суспензий клещей используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. При наличии автоматического гомогенизатора TissueLyser LT применяют следующие параметры для гомогенизации клещей рода *Hyalomma* (диаметр шариков – 7 мм; частота – 50 Гц/с; время гомогенизации – 10-12 мин; объем буфера – 700 мкл (ненапитавшийся клещ), 1000-1500 мкл (напитавшийся клещ и пулы клещей). В случае гомогенизации напитавшихся клещей в ступке их предварительно прокалывают стерильной одноразовой иглой в нескольких местах для выхода крови. Клещей растирают в 700 мкл (если проба состоит из одного ненапитавшегося клеща) или в 1-1,5 мл (если гомогенизируют пул клещей или напитавшегося клеща) 0,15 М раствора хлорида натрия, смешивая раствор с клещами небольшими объемами, затем полученную суспензию центрифугируют при 10 000 g в течение 1 мин и отбирают 100 мкл надосадочной жидкости для экстракции РНК.

Допускается хранение вышеперечисленного клинического материала до проведения исследования в течение суток при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед – при температуре не выше минус 16 °С. Для аутопсийного материала и насекомых предусмотрены следующие режимы хранения: ткани внутренних органов и комаров хранят 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее – при температуре минус 70 °С. Клещей хранят или живыми (до 1 мес) или 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее – при температуре минус 70 °С.

**ФОРМАТ FRT
СОСТАВ**

Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 (ТУ 9398-004-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|-----------------------|---|------------------|---------------|
| Лизирующий раствор | Прозрачная бесцветная жидкость ² | 22,5 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 1 | Прозрачная бесцветная жидкость ⁴ | 20 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 3 | Прозрачная бесцветная жидкость | 50 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 4 | Прозрачная бесцветная жидкость | 20 | 1 флакон |
| Сорбент | Суспензия белого цвета | 1,25 | 1 пробирка |
| РНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 5 пробирок |

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 4.

Комплект реагентов «РИБО-золь-С» вариант 50 (ТУ 9398-074-01897593-2008) – комплект реагентов для первого этапа выделения РНК из биологического материала – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем,</i> | <i>Кол-во</i> |
|----------------|--------------------------------------|---------------|---------------|
| Раствор D | Прозрачная бесцветная жидкость | 20 | 1 флакон |
| Раствор E | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,5 | 1 пробирка |
| Раствор A | Прозрачная жидкость оранжевого цвета | 15 | 1 флакон |
| Раствор B | Прозрачная бесцветная жидкость | 5 | 1 флакон |

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 3, 4.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 (ТУ 9398-071-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

² При хранении лизирующего раствора, раствора для отмывки 1 и раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|--------------------------|---|------------------|---------------|
| Раствор для лизиса | Прозрачная жидкость голубого цвета ⁴ | 15 | 1 флакон |
| Раствор для преципитации | Прозрачная бесцветная жидкость | 20 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 3 | Прозрачная бесцветная жидкость | 25 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 4 | Прозрачная бесцветная жидкость | 10 | 1 флакон |
| РНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 4 пробирки |

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 2, 3.

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 (ТУ 9398-106-01897593-12) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|-------------------------------|---|------------------|---------------|
| Лизирующий раствор МАГНО-сорб | Прозрачная бесцветная жидкость ³ | 70 | 4 флакона |
| Компонент А | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 4 пробирки |
| Раствор для отмывки 5 | Прозрачная бесцветная жидкость ⁵ | 60 | 4 флакона |
| Раствор для отмывки 6 | Прозрачная бесцветная жидкость | 20 | 4 флакона |
| Раствор для отмывки 7 | Прозрачная бесцветная жидкость | 6,0 | 4 флакона |
| Магнетизированная силика | Суспензия черного цвета | 0,9 | 4 пробирки |
| Буфер для элюции | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 12 пробирок |

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Объем исследуемого материала 1000 мкл. Входит в состав формы комплектации 5.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК участка генома вируса Западного Нила с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

³ При хранении лизирующего раствора и раствора для отмывки 5 при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|------------------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| RT-G-mix-2 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,015 | 1 пробирка |
| ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT WNV | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |
| ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,3 | 1 пробирка |
| Полимераза (TaqF) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 1 пробирка |
| ТМ-Ревертаза (MMIv) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,015 | 1 пробирка |
| ПКО кДНК WNV / STI | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| РНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 2 пробирки |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций амплификации, включая контроли. 1 комплект реагентов входит в состав форм комплектации 1, 2, 3, 4. 2 комплекта реагентов входят в состав формы комплектации 5.

К комплекту реагентов прилагаются следующие реагенты:

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|----------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,6 | 8 пробирок |
| ПКО WNV-rec | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 5 пробирок |
| ВКО STI-87-rec | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,12 | 5 пробирок |

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Проведение обратной транскрипции и амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления РНК вируса Западного Нила в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® WNV-FL»,

разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции РНК *WNV* из различных биологических объектов рекомендуется использовать следующие комплекты реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора:

- **«РИБО-преп»** – экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, СМЖ, лейкоцитарной фракции крови, гомогенатов тканей внутренних органов и комаров, осадков мочи, содержащих только эпителиальные клетки и не содержащих соли;
- **«РИБО-золь-С»** – экстракция РНК на первом этапе выделения из лейкоцитарной фракции крови, суспензий тканей внутренних органов, комаров и клещей, осадков мочи (в том числе содержащих соли). Второй этап выделения проводится с использованием комплекта **«РИБО-преп»** или **«РИБО-сорб»**;
- **«МАГНО-сорб»** – экстракция РНК из 1 мл плазмы и сыворотки крови, СМЖ.

При использовании формы комплектации 2 экстракция РНК проводится с помощью комплекта **«РИБО-преп»** в соответствии с Приложением 1. При использовании формы комплектации 3 экстракция РНК проводится с помощью комплектов **«РИБО-золь-С»** и **«РИБО-преп»** в соответствии с Приложением 2. При использовании формы комплектации 4 экстракция РНК проводится с помощью комплектов **«РИБО-золь-С»** и **«РИБО-сорб»** в соответствии с Приложением 3. При использовании формы комплектации 5 экстракция РНК проводится с помощью комплекта **«МАГНО-сорб»** в соответствии с инструкцией к набору.

ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИИ КДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в

режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы РНК – 10 мкл.

Способы внесения реактивов в пробирки:

1. Приготовить реакционную смесь на необходимое количество реакций - смешать в отдельной пробирке **ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT WNV**, **ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT**, полимеразу (**TaqF**), **ТМ-Ревертазу (MMIv)** и **RT-G-mix-2**, из расчета на каждую реакцию:

- 10 мкл **ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT WNV**;
- 5 мкл **ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT**;
- 0,5 мкл полимеразы (**TaqF**);
- 0,25 мкл **ТМ-Ревертазы (MMIv)**;
- 0,25 мкл **RT-G-mix-2**.

При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается амплификацией как минимум четырех контрольных образцов: положительного контроля экстракции (ПК), отрицательного контроля экстракции (ОК), положительного и отрицательного контролей ОТ-ПЦР (К+ и К-).

2. Раскапать приготовленные смеси в пробирки по **15 мкл**.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь не хранить.

3. Используя наконечник с фильтром, добавить **10 мкл РНК-пробы** в пробирки с каждой реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.

4. Для каждой панели исследуемых образцов необходимо поставить контроль амплификации кДНК:

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера**.
- б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК WNV/STI**.

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы и контролей.

Б. Проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы обратной транскрипции, амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (табл.1).

Таблица 1

| Цикл | Приборы роторного типа ⁴ | | | Приборы планшетного типа ⁵ | | |
|------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------|
| | Температура, °С | Время | Кол-во циклов | Температура, °С | Время | Кол-во циклов |
| 1 | 50 | 30 мин | 1 | 50 | 30 мин | 1 |
| 2 | 95 | 15 мин | 1 | 95 | 15 мин | 1 |
| 3 | 95 | 5 с | 5 | 95 | 5 с | 5 |
| | 56 | 25 с | | 56 | 30 с | |
| | 72 | 15 с | | 72 | 15 с | |
| 4 | 95 | 5 с | 40 | 95 | 5 с | 40 |
| | 56 | 25 с детекция флуоресц. сигнала | | 56 | 30 с детекция флуоресц. сигнала | |
| | 72 | 15 с | | 72 | 15 с | |

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM и JOE.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. **Лунка №1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой.**
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

⁴ Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁵ Например, iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК ВКО STI-87-rec;
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК WNV.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов.

Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Соответствие мишеней и каналов детекции

| ПЦР-смесь-1 | Детекция по каналу | |
|------------------------|--------------------|------------|
| | FAM/Green | JOE/Yellow |
| ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT WNV | ВКО | WNV |

Принцип интерпретации результатов следующий:

- кДНК WNV **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное во вкладыше. При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- кДНК WNV **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение, а по каналу JOE значение порогового цикла не определено или больше указанного во вкладыше.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t по каналу для флуорофора JOE, и по каналу для флуорофора FAM значение C_t также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование

соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления РНК вируса Западного Нила в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® WNV-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и положительного и отрицательного контролей экстракции РНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 3).

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Значение порогового цикла, C_t | |
|----------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | | по каналу для флуорофора JOE | по каналу для флуорофора FAM |
| OK | Экстракция РНК | Значение отсутствует | Определено значение меньше граничного |
| ПК | Экстракция РНК | Определено значение меньше граничного | Определено значение меньше граничного |
| К– | ПЦР | Значение отсутствует | Значение отсутствует |
| К+ | ПЦР | Определено значение меньше граничного | Определено значение меньше граничного |

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК.
2. Если для положительного контроля экстракции РНК (ПК) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить экстракцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК.

3. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, детектируемая на канале для флуорофора JOE.
4. Если для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и JOE определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, детектируемая на канале для флуорофора JOE, с постановкой К– не менее чем в трех повторах.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

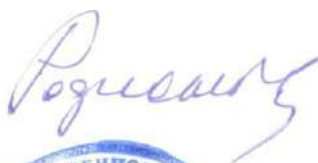
Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-преп», «РИБО-золь-С», «РИБО-сорб», «ПЦР-комплект» (кроме RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT *WNV*, ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT, полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv)) хранить при температуре от 2 до 8 °С. RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *WNV*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF) и ТМ-Ревертазу (MMIv) хранить при температуре не выше минус 16 °С. Комплект реагентов «МАГНО-сорб» хранить температуре от 2 до 25 °С. ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *WNV* хранить в защищенном от света месте.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *WNV-FL*» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18 e-mail: products@pcr.ru)⁶.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ



Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»



Е.Л. Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации

⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, СМЖ, лейкоцитарной фракции крови, мочи (без осадка солей), гомогенатов тканей внутренних органов и комаров с применением комплекта реагентов «РИБО-преп» (проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала)

Порядок работы

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. В случае экстракции РНК из **гомогенатов тканей, плазмы, сыворотки, СМЖ и гомогенатов комаров** отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-87-rec**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса и ВКО STI-87-rec** внести по **30 мкл** исследуемых суспензий органов, по **100 мкл** суспензий комаров, по **200 мкл** плазмы, сыворотки, СМЖ.
4. При экстракции из **лейкоцитарной фракции крови** или **осадка мочи** в данные исследуемые пробирки необходимо внести **300 мкл раствора для лизиса и 10 мкл ВКО STI-87-rec**. Затем отобрать две пробирки для отрицательного и положительного контролей экстракции.
5. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции и положительного контроля (ПК) экстракции внести **10 мкл ВКО STI-87-rec** и **300 мкл раствора для лизиса**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести также **10 мкл ПКО WNV-rec**.
6. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
7. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 10 000 г**.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

8. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
10. Центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
11. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
13. Центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
15. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
16. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
17. Центрифугировать пробирки при **10 000 g** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция РНК из лейкоцитарной фракции крови, осадков мочи, суспензий тканей внутренних органов, комаров и клещей с применением комплектов реагентов «РИБО-золь-С» и «РИБО-преп» (проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала)

Порядок работы

I этап

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-87-rec**, затем добавить по **300 мкл раствора D**. Промаркировать пробирки.
2. В случае изоляции РНК из суспензий клещей, комаров, внутренних органов в пробирки с раствором D и ВКО STI-87-rec добавляются по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром.
3. При экстракции РНК из лейкоцитарной фракции крови или осадков мочи в пробирки с осадками вносят по **300 мкл раствора D** и по **10 мкл ВКО STI-87-rec**.
4. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОК** и **10 мкл ВКО STI-87-rec**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **10 мкл ПК** *WNV-rec*, **10 мкл ВКО STI-87-rec** и **90 мкл ОК**. Плотное закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе.
5. Прогреть пробирки в термостате при 56 °С в течение 5 мин, периодически встряхивая их на вортексе.
6. Добавить к образцам, лизированным в растворе D, **30 мкл раствора E**, перемешать на вортексе и центрифугировать 5 с при 1500 g.
7. В эти же пробирки добавить **300 мкл раствора A**, перемешать на вортексе и центрифугировать 5 с при 1500 g.
8. В эти же пробирки внести **100 мкл раствора B**, перемешать на вортексе в течение 1-2 мин (раствор должен стать молочно-белым), затем поместить пробы на ледяную баню (при температуре от 0 до 4 °С) на 5 мин. После этого центрифугировать пробирки в течение 10 мин при 10 000 g.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

9. В новые пробирки объемом 1,5 мл внести по **300 мкл раствора для лизиса (из комплекта реагентов «РИБО-преп»)** и промаркировать соответственно номерам проб.
10. После центрифугирования раствор долженделиться на 2 фазы: нижнюю (фенольную), содержащую белки и ДНК, и верхнюю (водную), содержащую РНК. Необходимо аккуратно, не захватывая нижний слой, отобрать **200 мкл** верхней фазы и перенести ее в пробирку с раствором для лизиса. Тщательно перемешать смесь.

II этап

11. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате. Процентрифугировать в течение **5 с при 1500 g** для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
12. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 10 000 g**.
13. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
14. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
15. Процентрифугировать при **10 000 g в течение 2 мин** на микроцентрифуге.
16. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
17. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
18. Процентрифугировать при **10 000 g в течение 2 мин** на микроцентрифуге.
19. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

наконечник для каждой пробы.

20. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
21. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
22. Центрифугировать пробирки при **10 000 g в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция РНК из лейкоцитарной фракции крови, осадков мочи, суспензий тканей внутренних органов, комаров и клещей с применением комплектов реагентов «РИБО-золь-С» и «РИБО-сорб» (проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала)

Порядок работы.

I этап

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-87-рес**, затем добавить по **300 мкл раствора D**. Промаркировать пробирки.
2. В случае изоляции РНК из суспензий клещей, комаров в пробирки с раствором D и ВКО STI-87-рес добавляются по **100 мкл подготовленных проб**, в случае изоляции из суспензий тканей внутренних органов – **30 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром.
3. При экстракции РНК из лейкоцитарной фракции крови или осадков мочи в пробирки с осадками вносят по **300 мкл раствора D** и по **10 мкл ВКО STI-87-рес**.
4. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО** и **10 мкл ВКО STI-87-рес**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **10 мкл ПКО WNV-рес**, **10 мкл ВКО STI-87-рес** и **90 мкл ОКО**. Плотнo закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 1500 g на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.
5. Прогреть пробирки в термостате при 56 °С в течение 5 мин, периодически встряхивая их на вортексе.
6. Добавить к образцам, лизированным в растворе D, **30 мкл раствора E**, перемешать на вортексе и центрифугировать 5 с при 1500 g.
7. В эти же пробирки добавить **300 мкл раствора A**, перемешать на вортексе и центрифугировать 5 с при 1500 g.
8. В эти же пробирки внести **100 мкл раствора B**, перемешать на вортексе в течение 1-2 мин (раствор должен стать

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

- молочно-белым), затем поместить пробы на ледяную баню (при температуре от 0 до 4 °С) на 5 мин. После этого центрифугировать пробирки в течение 10 мин при 10 000 g.
9. В новые пробирки объемом 1,5 мл внести по **400 мкл лизирующего раствора (из комплекта реагентов «РИБО-сорб»)** и промаркировать соответственно номерам проб.
 10. После центрифугирования раствор долженделиться на 2 фазы: нижнюю (фенольную), содержащую белки и ДНК, и верхнюю (водную), содержащую РНК. Необходимо аккуратно, не захватывая нижний слой, отобрать верхнюю фазу (**400 мкл при экстракции РНК из осадков мочи и гомогенатов внутренних органов, гомогенатов комаров и клещей, 300 мкл – из осадков крови, 450 мкл при экстракции РНК из ОКО и ПКО**) и перенести ее в пробирку с лизирующим раствором. Тщательно перемешать смесь.

II этап

11. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.
12. Центрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 1500 g в течение 30 с на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
13. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 1500 g на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
14. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Процентрифугировать 45 с при 5000 g на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
15. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя пункту 13.
16. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе,

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

центрифугировать 1 мин при 6000 g на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.

17. Поместить пробирки в термостат при температуре 56 °C на 10 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

18. В пробирки добавить по **50 мкл РНК-буфера**, используя свободный от РНКаз наконечник с фильтром.

ВНИМАНИЕ! Вскрытую пробирку с РНК-буфером хранить при температуре не выше минус 16 °C.

19. Перемешать содержимое пробирок на вортексе. Поместить в термостат при температуре 56 °C на 5 мин (встряхивая пробы на вортексе каждую мин). Центрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (10 000 g) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

| | | | |
|---|-------------------------------------|--|--|
|  | Номер в каталоге |  | Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации |
|  | Код партии |  | Максимальное число тестов |
|  | Изделие для in vitro диагностики |  | Использовать до |
|  | Дата изменения |  | Обратитесь к руководству по эксплуатации |
|  | Ограничение температуры |  | Не допускать попадания солнечного света |
|  | Верхнее ограничение температуры |  | Дата изготовления |
|  | Производитель | | |

GUIDELINES

to **AmpliSens[®] *Leptospira*-FRT PCR kit**

for qualitative detection of 16S RNA of pathogenic *Leptospira* genospecies in the biological and autopsy material from humans and biological material from animals by the polymerase chain reaction (PCR) with real-time hybridization-fluorescence detection

AmpliSens[®]



Federal Budget Institute of
Science "Central Research
Institute for Epidemiology"
3A Novogireevskaya Street
Moscow 111123 Russia

TABLE OF CONTENTS

| | |
|--|---|
| INTENDED USE | 2 |
| AMPLIFICATION AND DATA ANALYSIS USING Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Australia) INSTRUMENTS | 3 |
| AMPLIFICATION AND DATA ANALYSIS USING iCycler iQ5 (Bio-Rad, USA) INSTRUMENT | 7 |

INTENDED USE

Guidelines describe the procedure of using **AmpliSens® *Leptospira*-FRT** PCR kit for qualitative detection of 16S RNA of pathogenic *Leptospira* genospecies in the biological material (blood and cerebrospinal fluid), autopsy material (brain, kidney, liver, lung tissue, and mesenterial lymph nodes) and material obtained from died animals (lung, brain, and kidney tissue) and animals suffering from acute leptospirosis (blood) or *Leptospira* persisting in kidneys (urine) by the polymerase chain reaction (PCR) with real-time hybridization-fluorescence detection using the following instruments:

- Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Australia);
- iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, USA).

AMPLIFICATION AND DATA ANALYSIS USING Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Australia) INSTRUMENTS

When working with Rotor-Gene 3000 one should use the Rotor-Gene version 6.1 and higher software and the Rotor-Gene 6000 versions 1.7 (build 67) software or higher for Rotor-Gene 6000.

Hereinafter, all the terms corresponding to different instruments and software are indicated in the following order: for Rotor-Gene 3000 / for Rotor-Gene 6000.

Programming the thermocycler

1. Turn on the instrument, run the Rotor-Gene software.
2. Insert the tubes or strips into the rotor of the Rotor-Gene 3000/6000/Q instrument (the rotor wells are numbered, the numbers are used for the further programming of the samples' order in the thermocycler).

NOTE: Well 1 must be filled with any test tube.

3. Set the amplification program:

Table 1

***Leptospira* cDNA amplification program**

| Step | Temperature, °C | Time | Fluorescence detection | Number of cycles |
|-------------|------------------------|-------------|-------------------------------|-------------------------|
| 1 | 50 | 30 min | – | 1 |
| 2 | 95 | 15 min | – | 1 |
| 3 | 95 | 20 s | – | 10 |
| | 65 | 50 s | – | |
| | 72 | 20 s | – | |
| 4 | 95 | 20 s | – | 38 |
| | 61 | 50 s | FAM/Green, JOE/Yellow | |
| | 72 | 20 s | – | |

4. Adjust fluorescence channel sensitivity. Click the **Calibrate/Gain Optimisation... button** in the **New Run Wizard** window. In the opened window:
 - perform the measurement of the fluorescence in the FAM/Green, JOE/Yellow channels (activate the **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring**);
 - perform the calibration in the selected channels before the first detection (tick the **Perform Calibration Before 1st Acquisition/ Perform Optimisation Before 1st Acquisition** option). Click the **Close** button;
 - for signal measurement optimisation for the selected channels set calibration of the FAM/Green channel from **3FI** to **7FI**, the JOE/Yellow channel – from **10FI** to **20FL**.
5. Start the amplification program by activating the **Start run** button. Name the experiment.
6. Enter the data into the grid of the samples (it opens automatically after the amplification has been started). Enter the names/numbers of the test samples in the **Name** column. Define the Negative control of amplification as NCA, the Positive control of amplification as C+. Set the type **Unknown** opposite all the test samples, the type **Positive control** – for the Positive controls, the type **Negative control** – for the Negative control of extraction, the type **NTC** – for the Negative control of amplification. Set the type **None** for the cells matching with the corresponding empty tubes.

Data analysis

Amplification data analysis in the JOE/Yellow channel (*Leptospira* DNA):

1. Activate the button **Analysis** in the menu, select the mode of the analysis **Quantitation**, activate the buttons **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show**.
2. Cancel the automatic choice of the threshold line level **Threshold**.
3. Activate the **Dynamic tube** and **Slope Correct** buttons in the menu of main window (**Quantitation analysis**).
4. In the **Calculation** menu (in the right part of the window) indicate the threshold line level **0.04** in the **Threshold** box.
5. Choose the parameter **More settings/Outlier Removal** and set **10 %** for the value of negative samples threshold (**NTC/Threshold**).
6. In the results grid (the **Quantitation Results** window) one will be able to see the **Ct** values.
7. For the Positive Control of Extraction (PCE) – **Positive Control *Leptospira*-rec** – the **Ct** value should be less than the boundary value 26.
8. For the Positive Control of Amplification (C+) – **Positive Control cDNA *Leptospira* (C+*Leptospira*)** – **Ct** value should be less than the boundary value 25.
9. For Negative Control of Extraction (C-) – **Negative Control (C-)** – **Ct** values should be

absent.

10. For Negative Control of Amplification (NCA) – **RNA-eluent** – Ct values should be absent.

11. The samples are positive if the determined Ct value is less than 32. If the Ct value in a sample is greater than this boundary value, then the sample is equivocal. The analysis of this sample should be repeated in two repeats.

Amplification data analysis in the FAM/Green channel (IC):

1. Activate the button **Analysis** in the menu, select the mode of the analysis **Quantitation**, activate the buttons **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show**.
2. Cancel the automatic choice of the threshold line level **Threshold**.
3. Activate the **Dynamic tube** and **Slope Correct** buttons in the menu of main window (**Quantitation analysis**).
4. In the **Calculation** menu (in the right part of the window) indicate the threshold line level **0.03** in the **Threshold** box.
5. Choose the parameter **More settings/Outlier Removal** and set **10 %** for the value of negative samples threshold (**NTC/Threshold**).
6. In the results grid (the **Quantitation Results** window) the Ct values should appear for **Internal Control STI-87-rec (IC)** in each test sample, Positive control of extraction (PCE) and Negative control of extraction (C–).
7. For Negative Control of Amplification (NCA) – **RNA-eluent** and Positive control of amplification (C+) – **Positive Control cDNA Leptospira (C+*Leptospira*)** – Ct values should be absent.
8. The Ct values determined for the test samples should not exceed the value 25 for the blood sediment and cerebrospinal fluid and the value 27 for the tissues homogenates. If the Ct value in a sample exceeds this boundary value, then the result is considered invalid in case of negative result in the JOE/Yellow channel. It is necessary to repeat the analysis of this sample from RNA extraction stage.

Boundary Ct values for control and test samples

| Sample | FAM/Green | JOE/Yellow |
|--------------|---|--------------------------------|
| | Detection of IC | Detection of <i>Leptospira</i> |
| PCE | Present | < 26 |
| C– | Present | Absent |
| NCA | Absent | Absent |
| C+ | Absent | < 25 |
| Test samples | <24.5 (Blood sediment and cerebrospinal fluid) <26.5 (Tissues homogenates) <27 (Urine sediment) | <32 |

Troubleshooting

1. If the Ct value is determined for the Negative Control of Extraction (C–) in the JOE/Yellow channel and/or for the Negative Control of Amplification (NCA) in the FAM/Green and JOE/Yellow channels in the results grid, it indicates contamination of reagents or samples. In such cases, the results of analysis are considered to be irrelevant. Analysis should be repeated and measures to detect and eliminate the source of contamination should be taken.
2. If no signal is detected for the Negative Control of extraction (C–) in the FAM/Green channel and/or for the Positive Control of Extraction (PCE) in the FAM/Green and JOE/Yellow channels, the results of analysis are considered invalid. Analysis of all samples should be repeated starting from the extraction stage.
3. If no signal is detected for Positive Control of Amplification (C+) in the JOE/Yellow channel, analysis results are considered invalid. Analysis of all samples should be repeated starting from the RT-PCR stage.

AMPLIFICATION AND DATA ANALYSIS USING iCycler iQ5 (Bio-Rad, USA)

INSTRUMENT

Programming the thermocycler

1. Turn on the instrument and the power supply unit of the optical block of the instrument. Start measurements not earlier than 30 min after turning on the optic part of the instrument.
2. Set the amplification program

Table 3

Leptospira cDNA amplification program

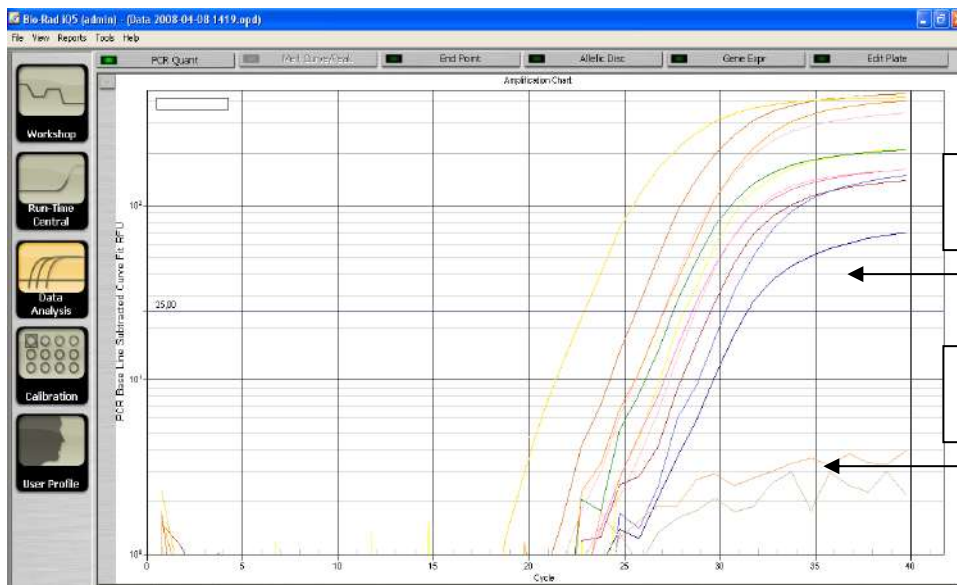
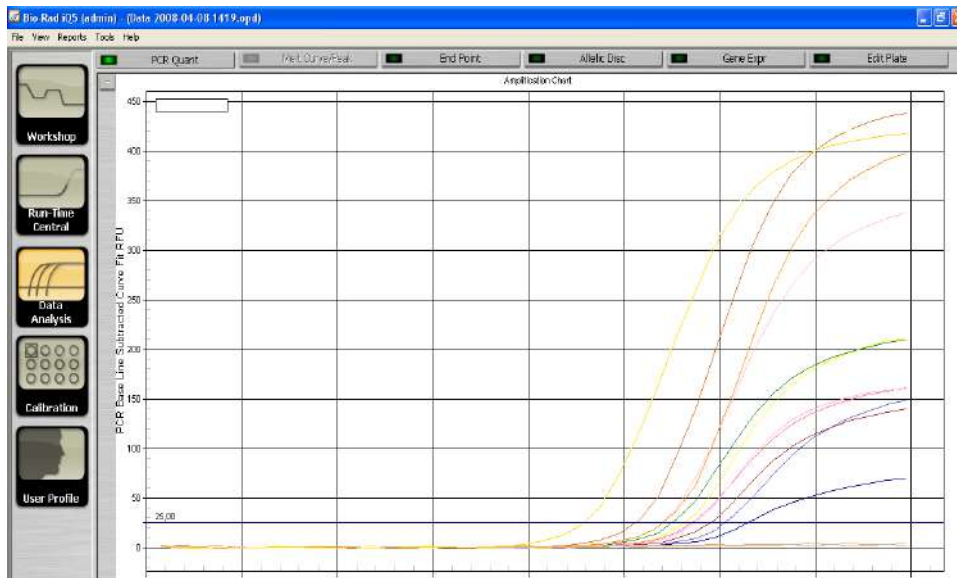
| Step | Temperature, °C | Time | Fluorescence detection | Number of cycles |
|------|-----------------|--------|------------------------|------------------|
| 1 | 50 | 30 min | – | 1 |
| 2 | 95 | 15 min | – | 1 |
| 3 | 95 | 20 s | – | 10 |
| | 65 | 50 s | – | |
| 4 | 95 | 20 s | – | 40 |
| | 61 | 50 s | FAM, JOE/HEX | |
| | 65 | 20 s | – | |

3. Set the plate setup (set the order of the tubes in the reaction chamber and the detection of fluorescent signal). Select the fluorophores (**Select/add fluorophores** button). Activate the fluorophores for the samples in the created protocol by the **Fluorophore loading in Whole Plate mode** button. Set the reaction volume (**Sample Volume**) as **25 µl**, the caps type (**Seal Type**) as **Domed Cap**, and the tubes type (**Vessel Type**) as **Tubes**. Then save the created protocol by clicking the **Save&Exit Plate Editing** button.
4. After that add the reagents and RNA samples into the tubes, insert the tubes into the instrument.
5. Run the experiment (**Run** button). Select **Run Persistent Plate**. Save the experiment.

Data analysis

Amplification data analysis in the JOE/Yellow channel (*Leptospira* DNA):

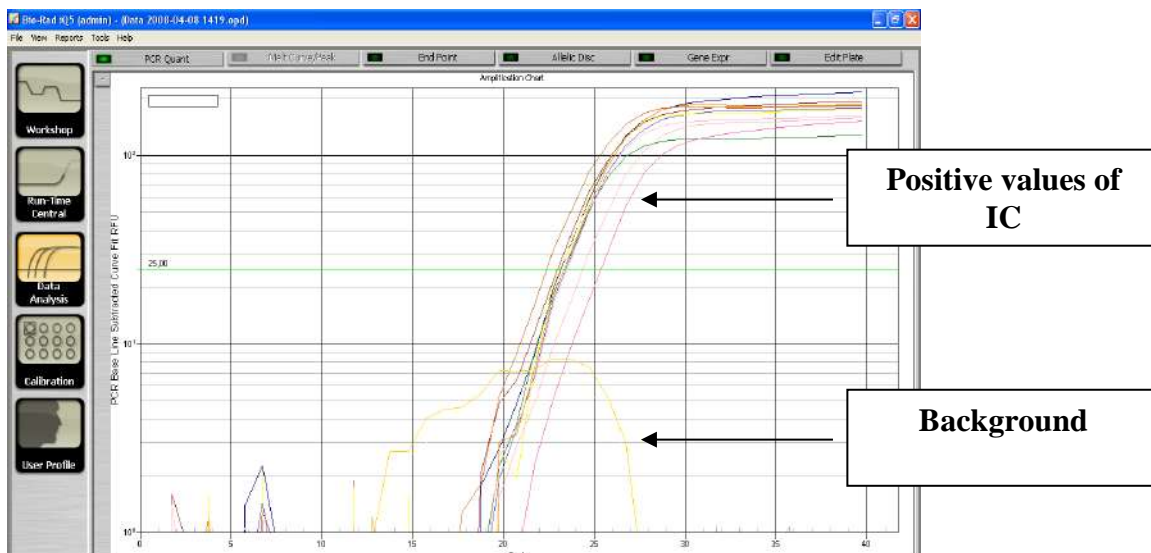
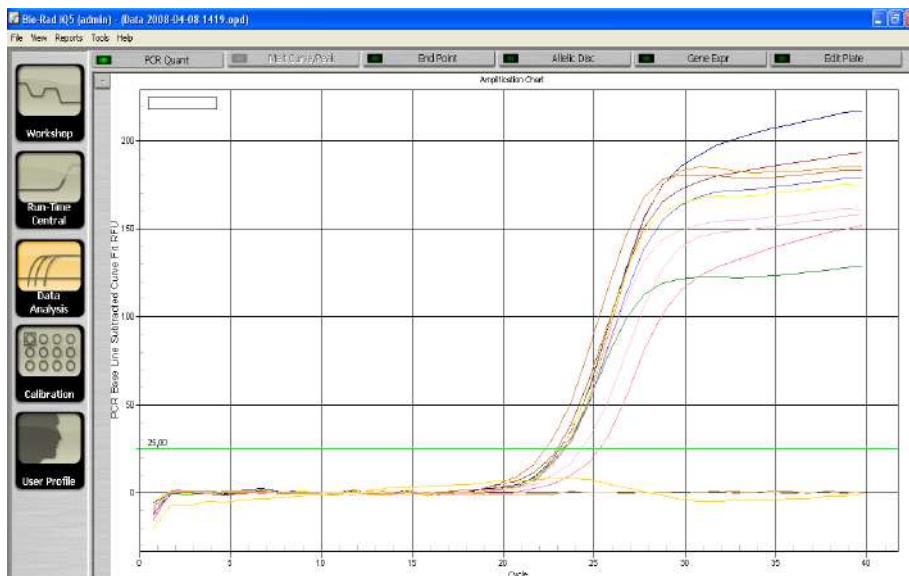
1. Click the **Data Analysis** button.
2. Select the **Base line** in the range 20-25 in the **Crossing Treshold User Defined** window. The threshold line is to cross only with sigmoid curves describing the accumulation of the signal detecting positive samples and controls. The threshold line is not to cross the curves of other shapes. If it happens, it is necessary to raise the threshold line level.



3. For the Positive Control of Extraction (PCE) – **Positive Control *Leptospira*-rec** – the *Ct* value should be less than the boundary value 27.
4. For the Positive Control of Amplification (C+) – **Positive Control cDNA *Leptospira* (C+*Leptospira*)** – *Ct* value should be less than the boundary value 26.
5. For Negative Control of Extraction (C-) – **Negative Control (C-)** – *Ct* values should be absent.
6. For Negative Control of Amplification (NCA) – **RNA-eluent** – *Ct* values should be absent.
7. The samples are positive if the determined *Ct* value is less than 32. If the *Ct* value in a sample is greater than this boundary value, than the sample is equivocal. The analysis of this sample should be repeated in two repeats.

Amplification data analysis in the FAM/Green channel (IC):

1. Select the **Base line** in the range 20-25 in the **Crossing Treshold User Defined** window.



2. The C_t values should appear for **Internal Control STI-87-rec (IC)** in each test sample, Positive control of extraction (PCE) and Negative control of extraction (C-).
3. For Negative Control of Amplification (NCA) – **RNA-eluent** and Positive control of amplification (C+) – **Positive Control cDNA *Leptospira* (C+*Leptospira*)** – C_t values should be absent.
4. The C_t values determined for the test samples should not exceed the value 27 for the blood sediment and cerebrospinal fluid and the value 29 for the tissues homogenates. For urine sediment samples the C_t value can be up to 29 cycle. If the C_t value in a sample exceeds this boundary value, then the result is considered invalid in case of negative result in the JOE/HEX channel. It is necessary to repeat the analysis of this sample from RNA extraction stage.


Boundary Ct values for control and test samples

| Sample | FAM/Green | JOE/Yellow |
|--------------|---|--------------------------------|
| | Detection of IC | Detection of <i>Leptospira</i> |
| PCE | Present | < 27 |
| C– | Present | Absent |
| NCA | Absent | Absent |
| C+ | Absent | < 26 |
| Test samples | <27 (Blood sediment and cerebrospinal fluid) <27 (Tissues homogenates) <29 (Urine sediment) | <32 |

Troubleshooting

1. If the Ct value is determined for the Negative Control of Extraction (C–) in the JOE/HEX channel and/or for the Negative Control of Amplification (NCA) in the FAM and JOE/HEX channels in the results grid, it indicates contamination of reagents or samples. In such cases, the results of analysis are considered to be irrelevant. Analysis should be repeated and measures to detect and eliminate the source of contamination should be taken.
2. If no signal is detected for the Negative Control of extraction (C–) in the FAM channel and/or for the Positive Control of Extraction (PCE) in the FAM and JOE/HEX channels, the results of analysis are considered invalid. Analysis of all samples should be repeated starting from the extraction stage.
3. If no signal is detected for Positive Control of Amplification (C+) in the JOE/HEX channel, analysis results are considered invalid. Analysis of all samples should be repeated starting from the RT-PCR stage.

List of Changes Made in the Guidelines

| VER | Location of changes | Essence of changes |
|----------------|--|---|
| 21.10.15 ME | Amplification and data analysis using Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Australia) instruments | Text was corrected with the template. Amplification program was added. The interpretation of results was added. It was added that for the data analysis the Slope Correct button should be activated |
| | Amplification and data analysis using iCycler iQ5 (Bio-Rad, USA) instrument | Information about work with the iCycler iQ instrument was deleted. The chapter was rewritten |
| 13.07.17 PM | Amplification and data analysis using Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Australia) instruments | In the table “Boundary Ct values for control and test samples” the column “Designation in the instruction manual” was deleted and the detection channels were indicated |
| | Amplification and data analysis using iCycler iQ5 (Bio-Rad, USA) instrument | |
| 31.01.19 EM | Amplification and data analysis using Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Australia) instruments | The Ct values for the blood sediment, cerebrospinal fluid and tissues homogenates were changed, the specification about urine sediment samples was deleted |
| | Amplification and data analysis using iCycler iQ5 (Bio-Rad, USA) instrument | The Ct values for the tissues homogenates were changed |
| 01.06.21 EM | Through the text | The symbol  was changed to NOTE: |
| | Cover page | The phrase “For research use only. Not for diagnostic procedures” was added |
| 13.07.23 EM | Footer | REF R-B49(RG,iQ)-CE was added |

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 10.02.09 № 992-17/09

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

Федерального

государственного

учреждения

науки «Центральный научно-

исследовательский институт

эпидемиологии» Федеральной

службы по надзору в сфере защиты

прав потребителей и благополучия

человека


В.И. Покровский

«07» ноября 2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК бактерий *Brucella* spp. в биологическом

материале и культурах микроорганизмов методом

полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-

флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] *Brucella* spp.-FL»

Набор реагентов выпускается в двух вариантах.

Вариант FEP.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 2 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формами **3** и **4** гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Вариант FRT.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формой **2** гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

СОСТАВ.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50 (ТУ 9398-003-01897593-2006) – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем (мл)</i> | <i>Кол-во</i> |
|-------------------------|---------------------------------|-------------------|---------------|
| Лизирующий раствор | Прозрачная бесцветная жидкость* | 15 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 1 | Прозрачная бесцветная жидкость* | 15 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 2 | Прозрачная бесцветная жидкость | 50 | 1 флакон |
| Сорбент универсальный | Суспензия белого цвета | 1,25 | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер для элюции ДНК | Прозрачная бесцветная жидкость | 5,0 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FER – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК бактерий *Brucella* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем (мл)</i> | <i>Кол-во</i> |
|--|--------------------------------|-------------------|------------------------------------|
| ПЦР-смесь-1-FER/FRT <i>Brucella</i> spp. раскапана под воск | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,008 | 55 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл |
| ПЦР-смесь-2-FL | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,77 | 1 пробирка |
| ПЦР-смесь-Фон | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |
| Минеральное масло для ПЦР | Бесцветная вязкая жидкость | 2,0 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Brucella</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ДНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

* При хранении лизирующего раствора и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Вариант FER Форма 3: **REF** B10-50-R0,5-FER; **REF** H-0593-2-5 Форма 4: **REF** B10-50-R0,2-FER; **REF** H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** HK7-0591-1-2; Форма 2: **REF** R-B10; **REF** H-0592-1-2

| Реактив | Описание | Объем (мл) | Кол-во |
|--------------------|---|-------------------|---------------|
| ОКО | Прозрачная жидкость от соломенно-желтого до бесцветного | 1,6 | 1 пробирка |
| ВКО STI-704 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК бактерий *Brucella* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

| Реактив | Описание | Объем (мл) | Кол-во |
|---|--------------------------------|-------------------|----------------------------|
| ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Brucella</i> spp. раскапана под воск | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,008 | 55 пробирок объемом 0,2 мл |
| ПЦР-смесь-2-FL | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,77 | 1 пробирка |
| ПКО ДНК <i>Brucella</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ПКО STI | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| ДНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

| Реактив | Описание | Объем (мл) | Кол-во |
|--------------------|---|-------------------|---------------|
| ОКО | Прозрачная жидкость от соломенно-желтого до бесцветного | 1,6 | 1 пробирка |
| ВКО STI-704 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов **«АмплиСенс® *Brucella* spp.-FL»** предназначен для выявления ДНК бактерий *Brucella* spp. (*B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*, *B.ovis*, *B.canis*, *B.neotomae*) в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Рекомендуется ознакомиться с МУ 3.1.7.1189-03 «ПРОФИЛАКТИКА И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Вариант FEP Форма 3: **[REF]** В10-50-R0,5-FEP; **[REF]** Н-0593-2-5 Форма 4: **[REF]** В10-50-R0,2-FEP; **[REF]** Н-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **[REF]** НК7-0591-1-2; Форма 2: **[REF]** R-B10; **[REF]** Н-0592-1-2

/ **[VER]** 07.11.08 /стр. 4 из 23

БРУЦЕЛЛЕЗА ЛЮДЕЙ», утвержденными Главным государственным санитарным врачом РФ 30.01.2003.

Вариант FEP. Формы комплектации 1 и 2 предназначены для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала и проведение ПЦР-амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Формы комплектации 3 и 4 предназначены для проведения ПЦР-амплификации ДНК. Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-В» для выделения ДНК из клинического материала (ТУ 9398-003-01897593-2006) производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Вариант FRT. Форма комплектации 1 предназначена для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала и проведения ПЦР-амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Форма комплектации 2 предназначена для проведения ПЦР-амплификации ДНК. Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-В» для выделения ДНК из клинического материала производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.

ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Для проведения анализа используется следующий материал:

Материал от людей:

- цельная периферическая кровь забирается в пробирку с 3 % ЭДТА из расчета 50 мкл ЭДТА на 1 мл крови.
- пунктат из лимфоузлов после взятия помещают в стерильную одноразовую пробирку со 100 мкл транспортной среды (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) или стерильного 0,9 % изотонического раствора натрия хлорида

(физиологического раствора).

- синовиальная жидкость помещают в стерильную одноразовую пробирку.

Материал от животных:

- кровь забирается в пробирку с 6 % ЭДТА из расчета 50 мкл ЭДТА на 1 мл крови.
- молоко отбирают в объеме 10-20 мл в стерильную посуду.
- содержимое брюшной полости и желудка, селезенка, печень абортированного плода.
- плацента и плодовые оболочки от абортировавших животных.
- содержимое бурс, гигром.
- в случае убоя животных для исследования отбирают парные лимфатические узлы с обеих сторон туши целиком (парааортальные, надвыменные, паховые, тазовые) и кусочки паренхиматозных органов (печень, селезенка), от самцов с признаками орхита или эпидидимита отбирают семенники с придатками.

Культуры микроорганизмов.

- культуры в жидких средах использовать без предварительной подготовки.
- подозрительные на *Brucella* spp. колонии ресуспендировать в 0,5 мл физиологического раствора.

Хранить материал до проведения исследования можно в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, 1 мес при температуре не выше минус 16 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Подготовка исследуемого материала.

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3. 1285–03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся с использованием стерильных ступок, пестиков, инструментов (ножниц, пинцетов,

скальпелей), дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл и наконечников с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т и утилизироваться в соответствии с вышеуказанными документами. Ступки, пестики и инструменты должны обрабатываться согласно СП 1.3. 1285–03.

Пробы цельной крови, консервированной ЭДТА, синовиальной жидкости, пунктаты из лимфоузлов, содержимое бурс и гигром, культуры микроорганизмов используют для выделения ДНК без предварительной подготовки после стадии обеззараживания (см. раздел «**Обеззараживание материала**»).

Пробы паренхиматозных органов, семенников, плодовых оболочек, плаценты (каждую отдельно) размером 1x1x1см, а лимфатические узлы целиком, гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков добавляют равный объем стерильного физиологического раствора и тщательно перемешивают. Образовавшуюся смесь отстаивают при температуре от 20 до 25 °С в течение 5 мин, затем верхнюю фазу по 0,4-0,5 мл переносят пастеровской пипеткой (или наконечником с аэрозольным барьером) в пробирки на 1,5 мл, проводят обеззараживание (см. раздел «**Обеззараживание материала**») и 0,1 мл используют для выделения ДНК. Нижнюю фазу вместе с пробиркой утилизируют в соответствии с требованиями СП 1.3. 1285–03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

Молоко в объеме 10 мл (при необходимости объем проб доводят до требуемого путем добавления физиологического раствора), обеззараживают (см. раздел «**Обеззараживание материала**») и центрифугируют при 3 тыс об/мин в течение 10-15 мин. Если осадок практически не виден, то в эту же пробирку вносят еще 10 мл материала и повторяют центрифугирование. Надосадочную жидкость осторожно отбирают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости. Осадок ресуспендируют в оставшейся надосадочной жидкости

и 0,1 мл суспензии используют для выделения ДНК.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ МАТЕРИАЛА.

Проводят согласно МУ 3.5.5.1034-01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I-IV групп патогенности, при работе методом ПЦР».

Обработка мертиолятом натрия.

1. В образцы биологического материала и культуры микроорганизмов (при необходимости после предварительной подготовки см. пункт **«Подготовка исследуемого материала»**) добавить 0,1 % натрия мертиолята (разведение 1:1000) до конечной концентрации 0,01 % (разведение 1:10000) и прогревают при температуре $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Далее в работе использовать по 100 мкл проб.
2. При работе с подозрительными культурами обработанные мертиолятом бактериальные культуры по 1 мл отдельными дозаторами перенести в пробирки объемом 1,5 мл и центрифугировать при 12000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удалить в емкость с дезинфицирующим раствором, осадок ресуспендировать в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида и использовать далее в работе.
3. Лизирующий раствор из комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.
4. В каждую пробирку со 100 мкл обеззараженного исследуемого материала внести по 300 мкл лизирующего раствора и инкубировать в течение 15 мин при температуре 65 °С.

Дальнейшие исследования проб проводить как с обеззараженным материалом по порядку процедур, описанных в разделе «Выделение ДНК из проб».

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

1. **Необходимо строго соблюдать СП 1.3. 1285–03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп**

- патогенности (опасности)».
2. Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.
 3. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности».
 4. Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным барьером. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.
 5. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
 6. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо облучать ультрафиолетовым светом в течение 30 мин.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.

(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

ЗОНА 1.

**Для выделения ДНК из исследуемого материала
требуются:**

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс

- об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
4. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
 5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
 6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
 7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
 8. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
 9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
 10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
 11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
 12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
 13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2.

Для проведения ПЦР-амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации требуются:

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

1. **Вариант FEP:** амплификатор для микропробирок 0,5 мл (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия или эквивалентный), для микропробирок 0,2 мл (например, «Gradient Palm Cyclor», «Corbett Research», Австралия или эквивалентный). Флуоресцентный ПЦР-детектор, например, «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия) или эквивалентный.
2. **Вариант FRT:** амплификатор «Rotor-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) или эквивалентный.
3. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

Вариант FEP Форма 3: **REF** B10-50-R0,5-FEP; **REF** H-0593-2-5 Форма 4: **REF** B10-50-R0,2-FEP; **REF** H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** HK7-0591-1-2; Форма 2: **REF** R-B10; **REF** H-0592-1-2

5. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
7. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,2 (0,5) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
10. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПРОБ.

(проводится в ЗОНЕ 1 - помещении для обработки исследуемого материала).

Объем пробы, необходимый для выделения ДНК, – 0,1 мл.

Порядок работы.

1. Подготовить **отрицательный контроль выделения ДНК (ОК)**. В пробирку объемом 1,5 мл внести **300 мкл лизирующего раствора и 100 мкл ОК** – отрицательного контрольного образца.
2. Отдельными наконечниками с аэрозольным барьером внести в каждую пробирку с пробами (см. раздел «Обеззараживание материала»), включая **ОК**, по **10 мкл ВКО STI-704**.
3. Пробы тщательно перемешать на вортексе, прогреть 5 мин при температуре 65 °С, осадить на вортексе 5 с. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), то необходимо центрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) и использовать для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенести ее в новую пробирку.
4. Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл ресуспендированного сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 5 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе

- на 5 мин.
5. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 6. Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 7. Добавить в пробы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 8. Повторить отмывку раствором для отмывки 2, следуя п. 7, удалить надосадочную жидкость полностью.
 9. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
 10. В пробирки добавить по **50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
 11. Процентрифугировать пробирки при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С и в течение года при температуре не выше минус 16 °С.

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.

(проводится в ЗОНЕ 2 - помещении для проведения ПЦР-амплификации).

Общий объем реакции - 25 мкл, объем ДНК-пробы - 10 мкл.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при температуре 95 °С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

Вариант FEP.

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella* spp.** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella* spp.**
3. Сверху добавить по капле **минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).
4. Приготовить 2 образца «Фон». Для этого в две пробирки с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella* spp.** на поверхность воска внести **17 мкл ПЦР-смеси-Фон**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella* spp.** Сверху добавить по капле **минерального масла для ПЦР.**

Б. Проведение амплификации.

1. В подготовленные для ПЦР пробирки внести по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК.
2. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
 - а) **отрицательный контроль (К-)** – вместо ДНК-пробы внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера.**
 - б) **положительный контроль (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Brucella*.**

3. Запустить на амплификаторе нужную программу (см. табл. 1). Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и снять программу с паузы.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

Таблица 1.

Программа амплификации ДНК *Brucella* spp.

| Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке): | | | | | | | Амплификаторы с матричным регулированием температуры: «Uno-2» («Biometra»), «MiniCycler», «PTC-100» («MJ Research») | | |
|---|-------------|----------|-------|---|----------|-------|---|----------|-------|
| «GeneAmp PCR System 2400» («Applied Biosystems»), «Терцик» (точный алгоритм регулирования) («ДНК-технология») | | | | «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research») | | | | | |
| цикл | температура | время | циклы | температура | время | циклы | температура | время | циклы |
| 0 | 95 °С | пауза | | 93 °С | пауза | | 95 °С | пауза | |
| 1 | 95 °С | 2 мин | 1 | 93 °С | 2 мин | 1 | 95 °С | 2 мин | 1 |
| 2 | 95 °С | 10 с | 10 | 93 °С | 10 с | 10 | 95 °С | 25 с | 10 |
| | 65 °С | 25 с | | 65 °С | 25 с | | 65 °С | 40 с | |
| | 72 °С | 10 с | | 72 °С | 25 с | | 72 °С | 25 с | |
| 3 | 95 °С | 10 с | 35 | 93 °С | 10 с | 35 | 95 °С | 25 с | 35 |
| | 56 °С | 25 с | | 56 °С | 25 с | | 56 °С | 40 с | |
| | 72 °С | 10 с | | 72 °С | 25 с | | 72 °С | 25 с | |
| 4 | 10 °С | хранение | | 10 °С | хранение | | 10 °С | хранение | |

4. По окончании выполнения программы амплификации приступить к детекции.

В. Детекция с помощью флуоресцентного ПЦР детектора «АЛА-1/4».

Установка параметров теста «Brucella».

1. Запустить программу «ALA_1» на компьютере, присоединенном к прибору.
2. В главном меню программы выбрать «Настройки» → «Тест».
3. Нажать кнопку «Новый» (в верхнем правом углу).
4. В открывшемся меню задать название теста «Brucella», нажать кнопку ОК.
5. В группе параметров «Каналы» отметить галочкой все задействованные в тесте каналы (FAM, HEX), в группе «ВКО» отметить канал, который используется для внутреннего контроля (FAM).

Вариант FEP Форма 3: **REF** B10-50-R0,5-FEP; **REF** H-0593-2-5 Форма 4: **REF** B10-50-R0,2-FEP; **REF** H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** HK7-0591-1-2; Форма 2: **REF** R-B10; **REF** H-0592-1-2

6. В полях «п-» и «п+» установить пороговые значения для отношения сигнал/фон по каналу для детекции специфической ДНК:
HEX: «п-» = 2.5, «п+» = 3.0;
В поле «ВКО/фон» задать пороговое значение отношения сигнала по каналу для детекции ВКО к фону:
«ВКО/фон» = 2.5.
7. В группе параметров «Уровень фона» установить значения флуоресценции, допустимые для фоновых пробирок:
FAM: = 100;
HEX: = 50.
8. Ввести названия мишеней в блок параметров «Привязка каналов» и соотнести их с каналами детекции. Для этого напечатать название мишени в свободное поле и нажать клавишу «Добавить», при этом новая мишень появится в столбце уже существующих в памяти прибора мишеней. Название мишени в столбце «Привязка каналов» выделить курсором и нажать соответствующую ей кнопку канала для детекции:
Brucella= HEX
9. Блокировать функцию «Доверительный интервал», установив в поле «Доверительный интервал», значение 555 %.
10. Нажать кнопку «Сохранить».

Измерение флуоресцентного сигнала.

1. Включить прибор и запустить программу «ALA_1» на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Задать протокол измерения. Для этого в главном меню выбрать «Протокол» → «Создать новый» или «Открыть», чтобы открыть созданный ранее протокол.
3. В окне протокола необходимо выбрать тип используемого ротора 36 x 0,5 или 48 x 0,2, ввести номер протокола, выбрать нужный тест («Brucella») в меню-вкладке «Тест» и ввести последовательность детектируемых образцов (в колонке «Образец»).
4. Обозначить образцы, которые являются фоновыми для данной группы образцов, как «фон» (используя сочетание клавиш «Ctrl» и «F»). В качестве образцов, обозначенных

- «ФОН» использовать пробирки с образцами «ФОН».
5. Закрывать окно редактирования протокола, нажав на кнопку «Exit» в верхнем левом углу панели. Протокол сохранить.
 6. Поставить пробирки в ячейки ротора в соответствии с заданной последовательностью и запустить детекцию, выбрав в меню «Протокол» → «Детекция» или значок «Детекция по протоколу» на панели инструментов (вверху экрана).

Учет результатов.

1. Полученные данные интерпретируются автоматически с помощью программы «ALA_1». Результаты в таблице представляются с помощью следующих обозначений:
«обнаружено» – положительный результат;
«не обнаружено» – отрицательный результат;
«сомнительно» – результат, который нельзя однозначно интерпретировать (сигнал по каналу, отведенному для детекции специфической ДНК, превышает пороговое значение, допустимое для отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов (сигнал в так называемой «серой зоне»);
«нд» – недостоверный результат (в образце не детектируется (не превышает заданного порогового значения) ни специфический сигнал, ни сигнал ВКО).
2. Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК (см. табл. 2).

Таблица 2.

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-анализа | Результат автоматической интерпретации | |
|----------|---------------------------------|--|----------------------------|
| | | канал FAM | канал HEX |
| «OK» | Выделение ДНК | ВКО+ | «Brucella - не обнаружено» |
| «К-» | ПЦР | ВКО- | «Brucella - нд» |
| «К+» | ПЦР | ВКО- | «Brucella – обнаружено» |

3. Образцы, для которых получен результат «нд» (кроме К-), требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если повторно получен результат «нд», требуется повторить

анализ образца, начиная с этапа выделения. Для образца «К-» результат «нд» является нормой.

4. Образцы, для которых получен результат «**сомнительно**», требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными.
5. Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз.
6. Если в отрицательном контроле (ОК или К-) детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

Вариант FRT.

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella spp.*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella spp.***

Б. Проведение амплификации.

1. В подготовленные для ПЦР пробирки внести по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК.
2. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
 - а) **отрицательный контроль (К-)** – вместо ДНК-пробы внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Brucella***.
 - в) **положительный контроль (ВК+)** – в подготовленные для ПЦР пробирки внести **10 мкл ПКО STI**.

В. Программирование амплификатора:

Для работы с прибором «Rotor-Gene» 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с прибором «Rotor-Gene» 6000- программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора «Rotor-Gene» 3000 / для англоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 / для русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000.

1. Нажать кнопку «New»/«Новый» в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать меню «Advanced»/«Детальный мастер» и шаблон запуска эксперимента «Dual Labeled Probe»/«Hydrolysis probes»/«Флуоресцентные зонды (TaqMan)». Нажать кнопку «New»/«Новый».
3. Выбрать тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Поставить отметку в окне рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено».
4. Нажать кнопку «Next»/«Далее».
5. Выбрать объем реакционной смеси: Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл. Для прибора «Rotor-Gene» 6000 должно быть активно (отмечено галочкой) окно «15 µl oil layer volume»/«15 µL объем масла/воска». (Если галочка не стоит в окне по умолчанию, поставить ее с помощью мышки).
6. Нажать кнопку «Next»/«Далее».
7. В верхней части окна нажать кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля».
8. Задать следующие параметры эксперимента:
 1. Hold/Удерж. темп-ры 95 °C – 5 мин
 2. Cycling/Циклирование 95 °C – 10 с
65 °C – 25 с
72 °C -10 с
Cycle repeats/Цикл повторить – 10 times/раз.
 3. Cycling2/Циклирование2 95 °C – 10 с
56 °C – 25 с – Детекция
72 °C -10 с

Cycle repeats/Цикл повторить – 35 times/раз.

4. Флюоресценцию измеряют при **56 °C** (во втором блоке циклирования) по каналам **FAM/Green, JOE/Yellow**.
5. Нажать кнопку «ОК»/«Да».
9. В нижней части окна нажать кнопку «Calibrate»/«Gain Optimisation...»/«Опт.уровня сигн.». В открывшемся окне нажать кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/«Опт.детек-мых». Для обоих красителей нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал** значение **5**, а в графе **Max Reading/Максим. Сигнал** значение **10**. В графе «Tube position/Позиция Пробирки» указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «*gain*»/«усиление сигнала», по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью. Поставить галочкой бокс в строке «Perform Calibration Before 1st Acquisition»/«Perform Optimisation Before 1st Acquisition»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Закрывать окно «Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала», нажав кнопку «**Close**»/«**Закрывать**». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».
10. Поместить предварительно подготовленные пробирки в амплификатор. Запустить амплификацию кнопкой «**Start run**»/«**Старт**».
11. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку «**Edit samples**»/«**Правка образцов**» (в нижней правой части основного окна). Все пробы и контроли обозначить в меню **Samples/Образцы** как **Unknown/Образец**.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Анализ результатов амплификации ВКО.

1. Нажать в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку «Cycling A. FAM»/«Cycling A. Green», «Show»/«Показать».

Вариант FEP Форма 3: **REF** B10-50-R0,5-FEP; **REF** H-0593-2-5 Форма 4: **REF** B10-50-R0,2-FEP; **REF** H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** HK7-0591-1-2; Форма 2: **REF** R-B10; **REF** H-0592-1-2

2. Отменить автоматический выбор Threshold/Порог.
3. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale видна кнопка Log scale).
4. В меню основного окна (Quantitation analysis/Количественный анализ) должна быть нажата кнопка «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
5. В меню основного окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) 0 %.
6. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0.1.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct, которые должны быть не более 31 для исследуемых образцов и контролей.

Анализ результатов амплификации ДНК *Brucella*.

1. Нажать в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку «Cycling A. JOE»/«Cycling A. Yellow», «Show»/«Показать».
2. Отменить автоматический выбор Threshold/Порог.
3. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale видна кнопка Log scale).
4. В меню основного окна (Quantitation analysis/Количественный анализ) должна быть нажата кнопка «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
5. В меню основного окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) 10 %.
6. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» выставить Threshold/Порог = 0.1.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК (см. табл. 3).

Таблица 3.

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-анализа | Значение Ct по каналу | |
|----------|---------------------------------|-----------------------|--------------|
| | | FAM/Green | JOE/Yellow |
| OK | Выделение ДНК | < 31 | Нет значений |
| К- | ПЦР | Нет значений | Нет значений |
| К+ | ПЦР | Нет значений | < 33 |
| ВК+ | ПЦР | < 31 | Нет значений |

- Образец считают положительным**, если значение Ct на канале JOE/Yellow менее 33.
- Образец считают отрицательным**, если по каналу JOE/Yellow для него значение Ct отсутствует, а по каналу FAM/Green для него определено значение Ct, не превышающее 31.

Результаты не подлежат учету:

- Отсутствие положительного сигнала в пробах с положительными контролями ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз.
- Если значение Ct на канале JOE/Yellow больше 33, а значение Ct по каналу FAM/Green не превышает 31, требуется повторить ПЦР и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения Ct на канале JOE/Yellow менее 33.

3. Образцы, для которых отсутствует значение Ct как по каналу JOE/Yellow, так и по каналу FAM/Green, или получено значение Ct по каналу FAM/Green более 31 требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае, если повторно получен аналогичный результат, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа выделения.
4. Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контроля (на канале JOE/Yellow) и для отрицательного контроля ПЦР (ДНК-буфер) (на любом из каналов) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

1. Обеззараживание биоматериалов и реагентов проводят для каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсосов на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 6 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте.


Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.-FL*» направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (499) 241-39-22, факс (499) 241-92-38), в адрес предприятия-изготовителя ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 305-39-39, факс (495) 305-54-23) и в адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Руководитель Производства
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

 Родионова Е.Н.

Директор ФГУЗ Российского научно-исследовательского
противочумного института «Микроб»
Роспотребнадзора

 Кутырев В.В.

Руководитель приемочных технических
и медицинских испытаний
Зав. лабораторией препаратов против чумы
и других особо опасных инфекций
ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора

 Саяпина Л.В.



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 13 марта 2019 года № ФСР 2009/04212

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления ДНК бактерий *Brucella* spp. в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® *Brucella* spp.-FL" по ТУ 9398-059-01897593-2008

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Производитель

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Место производства медицинского изделия

см. приложение

Номер регистрационного досье № РД-26122/11208 от 01.03.2019

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 3

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности 21.20.23.110

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 13 марта 2019 года № 1992
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

**Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения**



Д.Ю. Павлюков

0042653

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 13 марта 2019 года

№ ФСР 2009/04212

Лист 1

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления ДНК бактерий *Brucella spp.* в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL" по ТУ 9398-059-01897593-2008:

Вариант FER выпускается в четырех формах комплектации:

- Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FER (пробирки 0,5 мл);
- Форма 2 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FER (пробирки 0,2 мл);
- Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FER (пробирки 0,5 мл);
- Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FER (пробирки 0,2 мл);
- Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Вариант FRT выпускается в двух формах комплектации:

- Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT;
- Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT;
- Форма 3 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.

Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения



Д.Ю. Павлюков

0054910



July 2025

QIAamp[®] DNA Mini and Blood Mini Handbook

For DNA purification from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, dried blood spots (QIAamp DNA Mini Kit only), body fluids, cultured cells, swabs, and tissue (QIAamp DNA Mini Kit only)

Table of Contents

| | |
|---|----|
| Kit Contents | 4 |
| Storage | 6 |
| Intended Use | 7 |
| Safety Information | 8 |
| Quality Control | 9 |
| Introduction | 10 |
| Purification of viral RNA and DNA | 11 |
| Purification of DNA from urine | 11 |
| Purification of DNA from stool | 12 |
| Purification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues | 12 |
| Purification of DNA from forensic and human identity samples | 13 |
| Purification of high-molecular-weight DNA | 13 |
| Processing large sample volumes | 14 |
| High-throughput sample processing | 14 |
| Principle and procedure | 15 |
| Equipment and Reagents to Be Supplied by User | 21 |
| Important Notes | 23 |
| Preparation of reagents | 23 |
| Preparation of buffy coat | 26 |
| Handling of QIAamp Mini columns | 26 |
| Processing QIAamp Mini columns using a microcentrifuge (spin protocols) | 27 |
| Copurification of RNA | 34 |
| Elution mode for maximum yield or concentration | 35 |

| | |
|--|----|
| Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol) | 37 |
| Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Vacuum Protocol) | 42 |
| Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit) | 47 |
| Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol) | 53 |
| Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Vacuum Protocol) | 57 |
| Protocol: DNA Purification from Dried Blood Spots (QIAamp DNA Mini Kit) | 61 |
| Troubleshooting Guide | 64 |
| Appendix A: Determination of Concentration, Yield, Purity, and Length of DNA | 69 |
| Appendix B: Protocol for Cultured Cells | 71 |
| Appendix C: Protocols for Bacteria | 74 |
| Appendix D: Protocol for Yeast (e.g., Cultured <i>Candida</i> spp.) | 78 |
| Appendix E: Protocols for Viral DNA | 80 |
| Appendix F: Protocols for Eye, Nasal, or Pharyngeal Swabs | 84 |
| Appendix G: Protocol for Mitochondrial DNA from Platelets | 86 |
| Appendix H: Protocol for CSF and Bone Marrow on Hematological Slides | 88 |
| Appendix I: Protocol for Crude Cell Lysates and Other Samples | 90 |
| Appendix J: Protocol for Sample Concentration | 93 |
| Ordering Information | 94 |
| Document Revision History | 96 |

Kit Contents

| QIAamp DNA Kits Catalog no. Number of preps | Blood Mini (50) 51104 50 | Blood Mini (250) 51106 250 | Mini (50) 51304 50 | Mini (250) 51306 250 |
|--|---|---|-----------------------------------|-------------------------------------|
| QIAamp Mini Spin Columns | 50 | 250 | 50 | 250 |
| Collection Tubes (2 mL) | 150 | 750 | 150 | 750 |
| Buffer AL* | 12 mL | 2 x 33 mL | 12 mL | 2 x 33 mL |
| Buffer ATL | – | – | 14 mL | 50 mL |
| Buffer AW1* (concentrate) | 19 mL | 98 mL | 19 mL | 98 mL |
| Buffer AW2† (concentrate) | 13 mL | 66 mL | 13 mL | 66 mL |
| Buffer AE | 15 mL | 60 mL | 2 x 15 mL | 128 mL |
| QIAGEN® Protease | 1 vial‡ | 1 vial§ | – | – |
| Protease Solvent† | 1.2 mL | 5.5 mL | – | – |
| Proteinase K | – | – | 1.25mL | 6mL |
| Selection Guide | 1 | 1 | 1 | 1 |

*Contains chaotropic salt. Not compatible with disinfecting agents containing bleach; see page 8 for Safety Information.

† Contains sodium azide as a preservative.

‡ Resuspension volume 1.2 mL.

§ Resuspension volume 5.5 mL.

Ordering Information for separately available buffers and enzymes:

| Product | Contents | Cat. no. |
|-----------------------------|---|-----------------|
| Buffer AL (216 mL) | 216 mL Lysis Buffer AL | 19075 |
| Buffer ATL (200 mL) | 200 mL Tissue Lysis Buffer for 1000 preps | 19076 |
| Buffer AE (240 mL) | 240 mL Elution Buffer AE | 19077 |
| QIAGEN Protease (7.5 AU) | 7.5 Anson units per vial (lyophilized) | 19155 |
| QIAGEN Protease (30 AU) | 4 x 7.5 Anson units per vial (lyophilized) | 19157 |
| QIAGEN Proteinase K (2 mL) | 2 mL (>600 mAU/mL, solution) | 19131 |
| QIAGEN Proteinase K (10 mL) | 10 mL (>600 mAU/mL, solution) | 19133 |
| RNase A (17,500 U) | 2.5 mL (100 mg/mL; 7000 units/mL, solution) | 19101 |

Storage

QIAamp Mini spin columns and buffers can be stored dry at room temperature (15–25°C) for up to 1 year without showing any reduction in performance.

Lyophilized QIAGEN Protease can be stored at room temperature for up to 12 months without any decrease in performance. For storage longer than 12 months or if ambient temperatures constantly exceed 25°C, QIAGEN Protease should be stored dry at 2–8°C.

QIAGEN Protease reconstituted in Buffer AVE, Protease Solvent, and Protease Suspension buffer is stable for 12 months when stored at 2–8°C. Keeping the QIAGEN Protease stock solution at room temperature for prolonged periods of time should be avoided.

QIAamp DNA Mini Kits contain ready-to-use proteinase K solution, which is dissolved in a specially formulated storage buffer. The proteinase K is stable for up to 1 year after delivery when stored at room temperature. To prolong the lifetime of Proteinase K, storage at 2–8°C is recommended.

Intended Use

The QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit are intended for molecular biology applications. These products are not intended for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

All due care and attention should be exercised in the handling of the products. We recommend all users of QIAGEN products to adhere to the NIH guidelines that have been developed for recombinant DNA experiments, or to other applicable guidelines.

Safety Information

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, please consult the appropriate safety data sheets (SDSs). These are available online in convenient and compact PDF format at www.qiagen.com/safety where you can find, view, and print the SDS for each QIAGEN kit and kit components.

CAUTION

DO NOT add bleach or acidic solutions directly to the sample preparation waste.



The sample preparation waste contains guanidine hydrochloride from Buffers AL and AW1, which can form highly reactive compounds when combined with bleach.

If liquid containing these buffers is spilled, clean with suitable laboratory detergent and water. If the spilled liquid contains potentially infectious agents, clean the affected area first with laboratory detergent and water, and then with 1% (v/v) sodium hypochlorite.

Quality Control

In accordance with QIAGEN's ISO-certified Quality Management System, each lot of the QIAamp DNA Mini Kit and the QIAamp DNA Blood Mini Kit is tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

Introduction

QIAamp DNA Mini and QIAamp DNA Blood Mini Kits provide fast and easy methods for purification of total DNA for reliable PCR and Southern blotting. Total DNA (e.g., genomic, viral, mitochondrial) can be purified from whole blood, plasma, serum, buffy coat, bone marrow, other body fluids, lymphocytes, cultured cells, tissue, and forensic specimens.

The simple QIAamp spin and vacuum procedures, which are ideal for simultaneous processing of multiple samples, yield pure DNA ready for direct amplification in just 20 minutes. The QIAamp spin procedures can be fully automated on the QIAcube® for increased standardization and ease of use (see page 19). The QIAamp procedure is suitable for use with fresh or frozen whole blood and blood that has been treated with citrate, heparin, or EDTA. Prior separation of leukocytes is not necessary. Purification requires no phenol/chloroform extraction or alcohol precipitation, and involves very little handling. DNA is eluted in Buffer AE or water, ready for direct addition to PCR or other enzymatic reactions. Alternatively, it can be safely stored at -30°C to -15°C for later use. The purified DNA is free of protein, nucleases, and other contaminants or inhibitors.

DNA purified using QIAamp Kits is up to 50 kb in size, with fragments of approximately 20–30 kb predominating. DNA of this length denatures completely during thermal cycling and can be amplified with high efficiency.

For purification of genomic DNA from blood for in vitro diagnostics in Europe, the QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (cat. no. 61104) is CE-IVD marked according to the Regulation (EU) 2017/746.

Purification of viral RNA and DNA

For purification of viral RNA, the QIAamp Viral RNA Mini Kit (cat. no. 52904) is recommended. All buffers and components are guaranteed to be RNase free. Alternatively, for simultaneous purification of viral DNA and RNA, we recommend using the QIAamp MinElute® Virus Vacuum Kit (cat. no. 577144) or the QIAamp MinElute Virus Spin Kit (cat. no. 57704). These kits provide viral nucleic acid purification with minimal elution volumes for higher sensitivity in downstream applications. All buffers and components of these kits are guaranteed to be RNase free. Viral nucleic acid purification using the QIAamp MinElute Virus Spin Kit or the QIAamp Viral RNA Mini Kit can be fully automated on the QIAcube Connect for increased standardization and ease of use.

Purification of viral DNA is possible with QIAamp DNA Mini or QIAamp DNA Blood Mini Kits. Because cellular DNA copurifies with viral DNA, cell-free samples (e.g., plasma, serum) are necessary to obtain pure viral DNA. For preparation of DNA from free viral particles in fluids or suspensions (other than urine) using the blood and body fluid protocols, see Appendix F, page 80.

For purification of viral nucleic acids for in vitro diagnostics in Europe, the QIAamp DSP Virus Kit is CE-IVD marked according to the Regulation (EU) 2017/746.

Purification of DNA from urine

For preparation of cellular, bacterial, or viral DNA from urine, the QIAamp Viral RNA Mini Kit (cat. no. 52904) is recommended. Buffer AVL supplied with this kit is optimized to inactivate the numerous PCR inhibitors found in urine.

Purification of DNA from stool

The QIAamp DNA Fast Stool Mini Kit (cat. no. 51604) is recommended for preparation of DNA from stool. Stool samples typically contain many compounds that can degrade DNA and inhibit downstream enzymatic reactions. The QIAamp DNA Fast Stool Mini Kit removes these substances through the action of a proprietary reagent that efficiently adsorbs inhibitors, together with a lysis buffer that provides optimized conditions for inhibitor removal. DNA purification using the QIAamp DNA Fast Stool Mini Kit can be fully automated on the QIAcube Connect for increased standardization and ease of use.

QIAamp DNA Mini or QIAamp DNA Blood Mini Kits can also be used to purify viral DNA from stool, but removal of inhibitors is not as effective. See Appendix F, page 80.

Purification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues

The QIAamp DNA FFPE Advanced (cat.no. 56604) and QIAamp DNA FFPE Advanced UNG Kits (cat. no. 56704) are recommended for purification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues. The procedure consists of a simplified deparaffinization step, two lysis steps with in-between de-crosslinking and optional artifact removal (QIAamp DNA FFPE Advanced UNG Kit), and the established bind–wash–elute steps.

Purification of DNA from forensic and human identity samples

The QIAamp DNA Investigator Kit (cat. no. 56504) is recommended for purification of total (genomic and mitochondrial) DNA from a wide range of forensic and human identity samples, such as casework or crime-scene samples, dried blood, bone, and sexual assault samples, swabs, and filters. Purification is fast and efficient, and purified DNA performs well in downstream analyses, such as quantitative PCR and STR analysis, with high signal-to-noise ratios. The procedure is designed to ensure that there is no sample-to-sample cross-contamination. Purification of DNA using the QIAamp DNA Investigator Kit can be automated on the QIAcube.

Purification of high-molecular-weight DNA

To purify high-molecular-weight DNA, larger than 50 kb, we recommend using MagAttract HMW DNA Kit (cat. no. 67563), QIAGEN Genomic-Tips (cat. nos. 10223, 10243, and 10262), or Puregene® Kits (www.qiagen.com/Puregene-Kits).

The MagAttract HMW DNA Kit enables purification of high-molecular-weight DNA using a simple, magnetic bead-based protocol.

QIAGEN Genomic-Tips are gravity-flow, anion-exchange tips that enable purification of DNA of up to 150 kb from a wide range of sample types. The tips are available separately or, with QIAGEN Protease and buffers, as part of Blood & Cell Culture DNA Kits (cat. nos. 13323, 13343, and 13362).

Puregene Kits use a modified salting-out precipitation method for purification of archive-quality DNA of 100–200 kb. The procedure is scalable for large or small sample volumes, and kits are available for a wide range of sample types. An ongoing study of archived DNA has shown that purified DNA can be stored for at least 14 years without degradation.

Processing large sample volumes

QIAamp DNA Blood Midi and Maxi Kits (cat. nos. 51183 and 51192) are available for purification of DNA from up to 2 and 10 mL of blood, respectively. The QIAamp 96 DNA Blood Kit (cat. no. 51161) provides purification capabilities in a 96-well format for up to 200 μ L samples sizes. These kits use the same silica-membrane technology as the QIAamp DNA Blood Mini Kit.

The FlexiGene[®] DNA Kit (cat. no. 51206) provides scalable purification of genomic DNA from whole blood, buffy coat, or cultured cells in a single tube. The simple, rapid procedure yields pure DNA of up to 150 kb, ready to use in downstream applications such as PCR or Southern blotting.

Puregene Kits provide a scalable procedure for large or small sample volumes. The kits use a modified salting-out precipitation method for purification of archive-quality DNA and kits are available for a wide range of sample types.

High-throughput sample processing

Please contact one of the QIAGEN Technical Service Departments (see the back cover), or visit www.qiagen.com for detailed information on high-throughput QIAamp systems and automated solutions.

Principle and procedure

QIAamp DNA Mini and QIAamp DNA Blood Mini Kits are designed for rapid purification of an average of 6 µg of total DNA (e.g., genomic, viral, mitochondrial) from 200 µL of whole human blood and up to 50 µg of DNA from 200 µL of buffy coat, 5×10^6 lymphocytes, or cultured cells that have a normal set of chromosomes. The procedure is suitable for use with whole blood treated with citrate, heparin, or EDTA;* buffy coat; lymphocytes; plasma; serum; and body fluids. Samples may be either fresh or frozen. For larger volumes of whole blood or cultured cells, we recommend using QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits.

The QIAamp DNA Mini Kit performs all the functions of the QIAamp DNA Blood Mini Kit, and also allows rapid purification of DNA from solid tissue. On average, up to 30 µg of DNA can be purified from 25 mg of various human tissues.

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

Lysis with QIAGEN Protease or Proteinase K

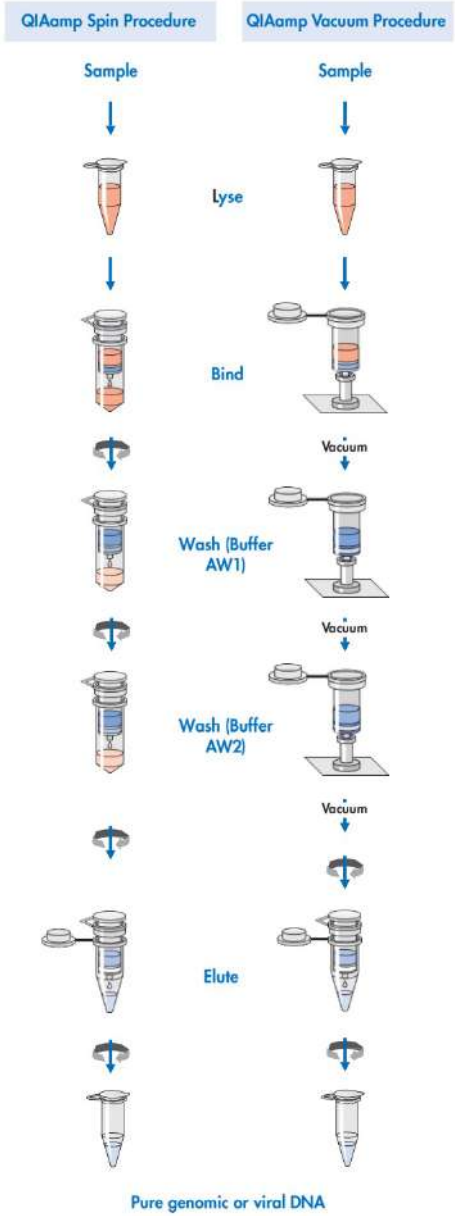
QIAamp DNA Blood Mini Kits contain QIAGEN Protease. Intensive research has shown that QIAGEN Protease is the optimal enzyme for use with the lysis buffer provided in the QIAamp DNA Blood Mini Kit. QIAGEN Protease is completely free of DNase and RNase activity.

When using the QIAamp DNA Blood Mini Kit for a sample that requires a modified protocol, please contact our Technical Service Department for advice about whether your lysis conditions are compatible with QIAGEN Protease. When >8 mM EDTA is used in conjunction with $>0.5\%$ SDS,* QIAGEN Protease activity decreases. For samples that require an SDS-containing lysis buffer or that contain high levels of EDTA, the QIAamp DNA Mini Kit is recommended. The QIAamp DNA Mini Kit contains proteinase K, which is the enzyme of choice for SDS-containing lysis buffers used in the tissue protocol, but which performs equally well in the blood and body fluid protocol. The activity of the proteinase K solution is 600 mAU/mL solution (or 40 mAU/mg protein). This activity provides optimal results in QIAamp protocols.

Purification on QIAamp Mini spin columns

The QIAamp DNA purification procedure comprises 4 steps and is carried out using QIAamp Mini spin columns in a standard microcentrifuge, on a vacuum manifold, or fully automated on the QIAcube (see page 19). The procedures are designed to ensure that there is no sample-to-sample cross-contamination and allow safe handling of potentially infectious samples.

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.



QIAamp Mini spin columns fit into most standard microcentrifuge tubes. In the spin protocol, due to the volume of filtrate, 2 mL collection tubes (provided) are required to support the QIAamp Mini spin column during loading and wash steps. For the vacuum protocol, a vacuum manifold (e.g., QIAvac 24 Plus manifold; and a vacuum pump capable of producing a vacuum of -800 to -900 mbar are required. Eluted DNA can be collected in standard 1.5 mL microcentrifuge tubes (not provided).

Adsorption to the QIAamp membrane

The lysate buffering conditions are adjusted to allow optimal binding of the DNA to the QIAamp membrane before the sample is loaded onto the QIAamp Mini spin column. DNA is adsorbed onto the QIAamp silica membrane during a brief centrifugation or vacuum step. Salt and pH conditions in the lysate ensure that protein and other contaminants, which can inhibit PCR and other downstream enzymatic reactions, are not retained on the QIAamp membrane. If the initial sample volume is larger than 200 μL , it will be necessary to load the lysate onto the QIAamp Mini spin column in several steps. If larger sample volumes are required, we suggest using QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits (Midi: 1–2 mL; Maxi: 5–10 mL starting material).

Removal of residual contaminants

DNA bound to the QIAamp membrane is washed in two centrifugation or vacuum steps. The use of two different wash buffers, Buffer AW1 and Buffer AW2, significantly improves the purity of the eluted DNA. Wash conditions ensure complete removal of any residual contaminants without affecting DNA binding.

Elution of pure nucleic acids

Purified DNA is eluted from the QIAamp Mini spin column in a concentrated form in either Buffer AE or water. Elution buffer should be equilibrated to room temperature (15–25°C) before it is applied to the column. Yields will be increased if the QIAamp Mini spin column is incubated with the elution buffer at room temperature for 5 minutes before centrifugation. The eluted genomic DNA is up to 50 kb in length (predominantly 20–30 kb) and is suitable for direct use in PCR or Southern blotting applications.

If the purified DNA is to be stored, elution in Buffer AE (10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0) and storage at –30°C to –15°C is recommended. If high pH or EDTA affects sensitive downstream applications, use water for elution. However, ensure that the pH of the water is at least 7.0 (deionized water from certain sources can be acidic). DNA stored in water is subject to degradation by acid hydrolysis.

Automated DNA purification on the QIAcube

Purification of DNA from blood, body fluids, tissues, and bacteria using the QIAamp DNA Mini Kit or the QIAamp DNA Blood Mini Kit can be fully automated on the QIAcube Connect (cat. no. 9002864) or the classic QIAcube. The innovative QIAcube instruments use advanced technology to process QIAGEN spin columns, enabling seamless integration of automated, low-throughput sample prep into your laboratory workflow. Sample preparation using the QIAcube instruments follows the same steps as the manual procedure (i.e., lyse, bind, wash, and elute), enabling you to continue using the QIAamp DNA Mini Kit and the QIAamp DNA Blood Mini Kit for purification of high-quality DNA.

The dedicated QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit (cat. no. 51126) enables automated DNA isolation from blood and DNA isolation from body fluids on the QIAcube Connect. The kit includes rotor adapters that are preloaded with QIAamp spin columns and elution tubes, delivering greater convenience and time savings. Furthermore, ease of use is increased and user errors are minimized. Waste is reduced, because the content of the dedicated kit is

tailored for purification on the QIAcube Connect and the superfluous tubes that are required for the manual procedure are not included.

QIAcube instruments are preinstalled with protocols for purification of plasmid DNA, genomic DNA, RNA, viral nucleic acids and proteins, plus DNA and RNA cleanup. The range of protocols available is continually expanding, and additional QIAGEN protocols can be downloaded free of charge at www.qiagen.com/qiacubeprotocols.



Figure 1. Automated DNA purification. DNA purification using the QIAamp DNA Mini Kit or the QIAamp DNA Blood Mini Kit can be fully automated on the QIAcube.

Equipment and Reagents to Be Supplied by User

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

- Ethanol (96–100%)*
- 1.5 mL microcentrifuge tubes
- Pipet tips with aerosol barrier
- Microcentrifuge (with rotor for 2 mL tubes)
- Vortexer
- Water bath or heating block at 56°C
- Phosphate-buffered saline (PBS) may be required for some samples

For vacuum protocols

- QIAvac 24 Plus (cat. no. 19413) or equivalent
- VacConnectors (cat. no. 19407)
- Vacuum Regulator (cat. 19530) for easy monitoring of vacuum pressures and easy releasing of vacuum
- Vacuum Pump (cat. no. 84010 [USA and Canada], 84000 [Japan], or 84020 [rest of world]) or equivalent pump capable of producing a vacuum of –800 to –900 mbar
- **For buccal swabs or large volumes:** Extension Tubes (cat. no. 15987)
- **Optional:** VacValves (cat. no. 19408)

*Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone.

- **Optional:** QIAvac Connecting System (cat. no. 19419)
- **Optional:** RNase A (100 mg/mL)

For tissues

- Additional water bath or heating block at 70°C
- **Optional:** Equipment for mechanical disruption, such as the TissueRuptor® or mortar and pestle, and liquid nitrogen

For buccal swabs

- Additional Buffer AL (cat. no. 19075)
- 2 mL microcentrifuge tubes
- For cotton or DACRON® swabs: Scissors or appropriate cutting device

For dried blood spots

- 3 mm single-hole paper puncher
- Two additional water baths or heating blocks at 85°C and 70°C

Important Notes

Preparation of reagents

QIAGEN Protease stock solution (store at 2–8°C)

When using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (50), pipet 1.2 mL protease solvent into the vial containing lyophilized QIAGEN Protease, as indicated on the label. When using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (250), pipet 5.5 mL protease solvent into the vial containing lyophilized QIAGEN Protease, as indicated on the label.

Dissolved QIAGEN Protease is stable for up to 12 months when stored at 2–8°C.

Note: If you also use QIAamp MinElute Virus Kits, be aware that the QIAGEN Protease supplied with these kits is reconstituted in protease resuspension buffer or Buffer AVE and is not compatible with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. After reconstituting a vial of QIAGEN Protease, label the resuspended QIAGEN Protease to indicate which buffer was used for resuspension.

Buffer AL* (store at room temperature, 15–25°C)

Mix Buffer AL thoroughly by shaking before use. Buffer AL is stable for 1 year when stored at room temperature.

Note: Do not add QIAGEN Protease or Proteinase K directly to Buffer AL.

* This contains chaotropic salt.

Buffer AW1* (store at room temperature, 15–25°C)

Buffer AW1 is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle.

Buffer AW1 is stable for 1 year when stored closed at room temperature.

Buffer AW2† (store at room temperature, 15–25°C)

Buffer AW2 is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) to Buffer AW2 concentrate as indicated on the bottle.

Buffer AW2 is stable for 1 year when stored closed at room temperature.

Carrier DNA

Use carrier DNA (e.g., poly dA, poly dT, poly dA:dT) when the sample is low copy (i.e., when <10,000 copies are present). For preparation of DNA from free viral particles in fluids or suspensions (other than urine) using the blood and body fluid protocols, we recommend the addition of 1 µL of an aqueous solution containing 5–10 µg of carrier DNA (e.g., poly dA, poly dT, poly dA:dT) to 200 µL Buffer AL. To ensure binding conditions are optimal, increase the volume of ethanol added at step 6 from 200 to 230 µL. Elution should be in 60 µL Buffer AE.

* This contains chaotropic salt.

† This contains sodium azide as preservative.

Amounts of starting material

Use the amounts of starting material indicated in Table 1.

Table 1. Amounts of starting material for QIAamp Mini Procedures

| Sample | Amount |
|----------------------|---------------------------|
| Blood, plasma, serum | 200 µL |
| Buffy | 200 µL |
| Tissue | 25 mg* |
| Cells (diploid) | 5 × 10 ⁶ cells |

*When isolating DNA from spleen, 10 mg samples should be used.

Small samples should be adjusted to 200 µL with PBS before loading. For samples larger than 200 µL, the amount of lysis buffer and other reagents added to the sample before loading must be increased proportionally (see note below). Application of the lysed sample to the QIAamp Mini spin column will require more than one loading step if the initial sample volume is increased. The amounts of Buffer AW1 and Buffer AW2 used in the wash steps do not need to be increased.

Scaling up the tissue protocol is possible in principle. The volumes of Buffer ATL and proteinase K used should be increased proportionally, while the volumes of wash and elution buffers should remain constant. The user should determine the maximum amount of tissue used. It is important not to overload the column, as this can lead to significantly lower yields than expected.

Note: All QIAamp buffers can be purchased separately to supplement the QIAamp DNA Mini and QIAamp DNA Blood Mini Kits. QIAGEN Proteinase K is recommended for use with tissue samples. QIAGEN Protease is suitable for genomic DNA preparation from blood, cells, and body fluids.

Preparation of buffy coat

Buffy coat is a leukocyte-enriched fraction of whole blood. Preparing a buffy coat fraction from whole blood is simple and yields approximately 5–10 times more DNA than an equivalent volume of whole blood.

Prepare buffy coat by centrifuging whole blood at $2500 \times g$ for 10 minutes at room temperature (15–25°C). After centrifugation, three different fractions are distinguishable: the upper clear layer is plasma; the intermediate layer is buffy coat, containing concentrated leukocytes; and the bottom layer contains concentrated erythrocytes.

Handling of QIAamp Mini columns

Because of the sensitivity of nucleic acid amplification technologies, the following precautions are necessary when handling QIAamp Mini columns to avoid cross-contamination between sample preparations:

- Carefully apply the sample or solution to the QIAamp Mini column. Pipet the sample into the QIAamp Mini column without wetting the rim of the column.
- Change pipette tips between all liquid transfers. The use of aerosol-barrier pipette tips is recommended.
- Avoid touching the QIAamp membrane with the pipette tip.
- After all pulse-vortexing steps, briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tubes to remove drops from the inside of the lid.
- Wear gloves throughout the entire procedure. In case of contact between gloves and sample, change gloves immediately.

Centrifugation

QIAamp Mini columns will fit into most standard 1.5–2 mL microcentrifuge tubes. Additional 2 mL collection tubes are available separately.

Centrifugation of QIAamp Mini columns is performed at 6000 x g (8000 rpm) to reduce centrifuge noise. Centrifuging QIAamp Mini columns at full speed will not affect DNA yield. Centrifugation at lower speeds is also acceptable, provided that nearly all of each solution is transferred through the QIAamp membrane. When preparing DNA from buffy coat or lymphocytes, full-speed centrifugation is recommended to avoid clogging.

All centrifugation steps should be carried out at room temperature (15–25°C).

Processing QIAamp Mini columns using a microcentrifuge (spin protocols)

Close the QIAamp Mini column before placing it in the microcentrifuge. Centrifuge as described.

- Remove the QIAamp Mini column and collection tube from the microcentrifuge. Place the QIAamp Mini column in a new collection tube. Discard the filtrate and the collection tube.
Note: The filtrate may contain hazardous waste and should be disposed of appropriately.
- Open only one QIAamp Mini column at a time, and take care to avoid generating aerosols.
- For efficient parallel processing of multiple samples, fill a rack with collection tubes to which the QIAamp Mini columns can be transferred after centrifugation. Used collection tubes containing the filtrate can be discarded, and the new collection tubes containing the QIAamp Mini columns can be placed directly in the microcentrifuge.

The QIAvac 24 Plus

The QIAvac 24 Plus is designed for fast and efficient vacuum processing of up to 24 QIAGEN spin columns in parallel. Samples and wash solutions are drawn through the column membranes by vacuum instead of centrifugation, providing greater speed and reduced hands-on time in purification procedures.

In combination with the QIAvac Connecting System (optional), the QIAvac 24 Plus can be used as a flow-through system. The sample flow through is collected in a separate waste bottle.

For maintenance of the QIAvac 24 Plus, please refer to the handling guidelines in the *QIAvac 24 Plus Handbook*.

Processing QIAamp Mini Columns on the QIAvac 24 Plus (vacuum protocols)

QIAamp Mini spin columns are processed on the QIAvac 24 Plus using disposable VacConnectors and reusable VacValves. VacValves (optional) are inserted directly into the luer slots of the QIAvac 24 Plus manifold and ensure a steady flow rate, facilitating parallel processing of samples of different natures (e.g., blood and body fluids), volumes, or viscosities. They should be used if sample flow rates differ significantly to ensure consistent vacuum. VacConnectors are disposable connectors that fit between QIAamp Mini columns and VacValves or between the QIAamp Mini columns and the luer slots of the QIAvac 24 Plus. They prevent direct contact between the spin column and VacValve during purification, avoiding any cross-contamination between samples. VacConnectors are discarded after a single use.

Handling guidelines for the QIAvac 24 Plus

- Always place the QIAvac 24 Plus on a secure bench top or work area. If dropped, the QIAvac 24 Plus manifold may crack.
- Always store the QIAvac 24 Plus clean and dry. For cleaning procedures, see the *QIAvac 24 Plus Handbook*.
- The components of the QIAvac 24 Plus are not resistant to certain solvents (Table 2). If these solvents are spilled on the unit, rinse it thoroughly with water.
- To ensure consistent performance, do not apply silicone or vacuum grease to any part of the QIAvac 24 Plus manifold.
- Always use caution and wear safety glasses when working near a vacuum manifold under pressure.
- Contact QIAGEN Technical Services or your local distributor for information concerning spare or replacement parts.
- The vacuum pressure is the pressure differential between the inside of the vacuum manifold and the atmosphere (standard atmospheric pressure 1013 millibar or 760 mm Hg) and can be measured using the QIAvac Connecting System or a vacuum regulator (see Figure 3). The vacuum protocol requires a vacuum pump capable of producing a vacuum of -800 to -900 mbar (e.g., QIAGEN, Vacuum Pump). Higher vacuum pressures must be avoided. Use of vacuum pressures lower than recommended may reduce DNA yield and purity and increase the frequency of clogged membranes.

Table 2. Chemical resistance properties of QIAvac 24 Plus

Resistant to

| | | |
|--------------|-----------------------|-------------------|
| Acetic acid | Chaotropic salts | Chlorine bleach |
| Chromic acid | Concentrated alcohols | Hydrochloric acid |
| SDS | Sodium chloride | Sodium hydroxide |
| Tween® 20 | Urea | |

Not Resistant to:

| | | |
|---------|------------|--------|
| Benzene | Chloroform | Ethers |
| Phenol | Toulene | |



Figure 2. Schematic diagram of the Vacuum Regulator.

Setup of the QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Connect the QIAvac 24 Plus to a vacuum source. If using the QIAvac Connecting System, connect the system to the manifold and vacuum source as described in Appendix A of the *QIAvac 24 Plus Handbook*.

2. Insert a VacValve into each luer slot of the QIAvac 24 Plus that is to be used (see Figure 3). Close unused luer slots with luer plugs or close the inserted VacValve.

VacValves should be used if flow rates of samples differ significantly to ensure consistent vacuum.

3. Insert a VacConnector into each VacValve (see Figure 3).

Perform this step directly before starting the purification to avoid exposure of VacConnectors to potential contaminants in the air.

4. Place the QIAamp Mini columns into the VacConnectors on the manifold (see Figure 3).

5. If necessary, insert an Extension Tube into each QIAamp Mini column (see Figure 4).

Extension Tubes are required for processing buccal swabs or large volumes.

6. For nucleic acid purification, follow the instructions in the vacuum protocols. Discard the VacConnectors appropriately after use.

Leave the lid of the QIAamp Mini column open while applying vacuum.

Switch off the vacuum between steps to ensure that a consistent, even vacuum is applied during processing. For faster vacuum release, a vacuum regulator should be used (see Figure 3).

Note: Each VacValve can be closed individually when the sample is completely drawn through the spin column, allowing parallel processing of samples of different volumes or viscosities.

7. After processing samples, clean the QIAvac 24 Plus (see “Cleaning and Decontaminating the QIAvac 24 Plus” in the *QIAvac 24 Plus Handbook*).

Note: Buffers AL and AW1 used in QIAamp DNA Mini and QIAamp DNA Blood Mini procedures are not compatible with disinfecting agents containing bleach. See page 6 for safety information.

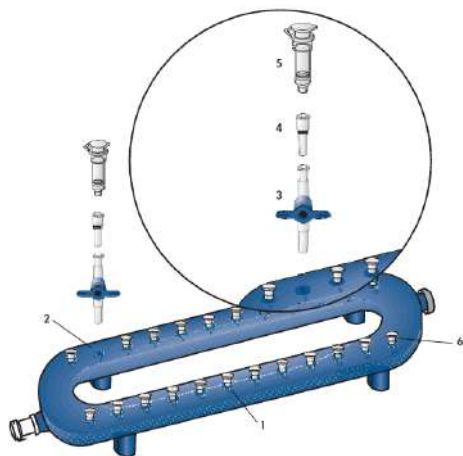


Figure 3. Setting up the QIAvac 24 Plus with QIAamp Mini columns using VacValves and VacConnectors.

- | | | | |
|---|---------------------------------|---|---------------------------------|
| 1 | QIAvac 24 plus vacuum manifold | 4 | VacConnector |
| 2 | Luer slot of the QIAvac 24 Plus | 5 | QIAamp Mini column |
| 3 | VacValve | 6 | Luer slot closed with luer plug |



Figure 4. Assembly of QIAamp Mini columns with extension tubes (for buccal swabs or large volumes).

- | | |
|---|--|
| <p>1 VacValve</p> <p>2 VacConnector</p> | <p>3 QIAamp Mini Column</p> <p>4 Extension tube*</p> |
|---|--|

* Must be purchased separately

Processing QIAamp Mini columns on the QIAcube

Sample preparation using the QIAcube follows the same steps as the manual procedure (i.e., lyse, bind, wash, and elute). For more information about the automated procedure, see the relevant protocol sheet available at www.qiagen.com/MyQIAcube

Copurification of RNA

QIAamp Mini spin columns copurify DNA and RNA when both are present in the sample (see Table 3). RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions but will not inhibit PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 μL of an RNase A stock solution (100 mg/mL) should be added to the sample prior to the addition of Buffer AL. RNase A (cat. no. 19101) is not supplied with the kits and should be purchased separately. Ensure that the RNase A used is completely free of DNase activity.

Table 3. Yields of nucleic acids purified from various sources with QIAamp Kits

| Sample | Nucleic acid yield (μg) without RNase A treatment | DNA yield (μg) with RNase A treatment |
|------------------------------------|--|--|
| Blood (200 μL) | 4–12 | 4–12 |
| Buffy coat (200 μL) | 25–50 | 25–50 |
| Cultured cells (5×10^6) | 20–30 | 15–20 |
| Liver (25 mg) | 60–115 | 10–30 |
| Brain (25 mg) | 35–60 | 15–30 |
| Lung (25 mg) | 8–20 | 5–10 |
| Heart (25 mg) | 25–45 | 5–10 |
| Kidney (25 mg) | 40–85 | 15–30 |
| Spleen (10 mg) | 25–45 | 5–30 |

DNA was purified with the QIAamp kits following the standard protocols.

Elution mode for maximum yield or concentration

The yield of genomic DNA depends on the sample type and the number of cells in the sample. Typically, a 200 μL sample of whole blood from a healthy individual will yield 3–12 μg of DNA. (If higher yields are required, use QIAamp DNA Blood Midi or QIAamp DNA Blood Maxi Kits with up to 2 mL or up to 10 mL blood, respectively.) For most whole blood samples, a single elution with 200 μL elution buffer is sufficient. Samples with elevated white blood cell (WBC) counts, ranging from 1×10^7 to 1.5×10^7 cells/mL will yield between 13 and 20 μg of DNA. If such a sample is loaded onto the column, approximately 80% of the DNA will elute in the first 200 μL and up to 20% more in the next 200 μL . In samples with WBC counts exceeding 1.5×10^7 cells/mL, up to 60% of the DNA will elute in the first 200 μL and up to 70% of the remaining material in each subsequent 200 μL (see Table 4). Elution into a fresh tube is recommended to prevent dilution of the first eluate. More than 200 μL should not be eluted into a 1.5 mL microcentrifuge tube because the spin column will contact the eluate, leading to possible aerosol formation of samples during centrifugation. Eluting in $4 \times 100 \mu\text{L}$ instead of $2 \times 200 \mu\text{L}$ does not increase elution efficiency. In all cases, a single elution with 200 μL of elution buffer will provide sufficient DNA to perform multiple amplification reactions.

For some downstream applications, concentrated DNA may be required. Elution with volumes of less than 200 μL increases the final DNA concentration in the eluate significantly but slightly reduces overall DNA yield (see Table 5). For samples containing $<3 \mu\text{g}$ of DNA, eluting the DNA in 100 μL is recommended. For samples containing less than 1 μg of DNA, only one elution in 50 μL Buffer AE or water is recommended.

Table 4. Total nucleic acid yields with QIAamp Kits using successive elutions

| Sample | Amount | Yield (µg) | | | Total |
|-------------|--------------------------------------|------------|-----------|-----------|--------|
| | | Elution 1 | Elution 2 | Elution 3 | |
| Whole blood | 200 µL | 3–8 | 1–2 | 0–2 | 4–12 |
| Lymphocytes | 5 x 10 ⁶ cells/ 200 µL | 13–18 | 5–8 | 3–5 | 20–30 |
| Buffy coat | 200 µL | 15–25 | 8–15 | 5–10 | 28–50 |
| Liver* | 25 mg | 25–45 | 25–45 | 10–25 | 60–115 |
| Brain* | 25 mg | 20–30 | 10–20 | 5–10 | 35–60 |
| Lung* | 25 mg | 5–10 | 2–6 | 1–4 | 8–20 |
| Heart* | 25 mg | 15–25 | 8–15 | 2–5 | 25–45 |
| Kidney* | 25 mg | 25–40 | 20–30 | 5–15 | 50–85 |
| Spleen* | 10 mg | 15–25 | 8–15 | 2–5 | 25–45 |

DNA was purified with QIAamp Kits following standard protocols. Successive elutions were each performed with 200 µL Buffer AE.

* Results refer to the QIAamp DNA Mini Kit only.

Table 5. Effect of elution volume on yield and concentration

| Elution volume | Yield (µg) | Yield (%) | DNA concentration (ng/µL) |
|----------------|------------|-----------|---------------------------|
| 200 | 6.80 | 100 | 34.0 |
| 150 | 6.51 | 95 | 43.4 |
| 100 | 6.25 | 92 | 62.5 |
| 50 | 5.84 | 86 | 116.8 |

DNA was purified with QIAamp Kits following standard protocols. Average values obtained from 20 preparations are shown.

Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, and body fluids using a microcentrifuge. For total DNA purification using a vacuum manifold, see “Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Vacuum Protocol)” on page 42.

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).
- A total of 200 µL of whole blood yields 3–12 µg of DNA. Preparation of buffy coat (see page 26) is recommended if a higher yield is required.

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C for use in step 4.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Pipet 20 μL QIAGEN Protease (or proteinase K) into the bottom of a 1.5 mL microcentrifuge tube.
2. Add 200 μL sample to the microcentrifuge tube. Use up to 200 μL whole blood, plasma, serum, buffy coat, or body fluids, or up to 5×10^6 lymphocytes in 200 μL PBS.

If the sample volume is less than 200 μL , add the appropriate volume of PBS. QIAamp Mini spin columns copurify RNA and DNA when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 μL of an RNase A stock solution (100 mg/mL) should be added to the sample before addition of Buffer AL.

Note: It is possible to add QIAGEN Protease (or proteinase K) to samples that have already been dispensed into microcentrifuge tubes. In this case, it is important to ensure proper mixing after adding the enzyme.

3. Add 200 μL Buffer AL to the sample. Mix by pulse-vortexing for 15 s.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

If the sample volume is larger than 200 μL , increase the amount of QIAGEN Protease (or proteinase K) and Buffer AL proportionally; for example, a 400 μL sample will require 40 μL QIAGEN Protease (or proteinase K) and 400 μL Buffer AL. If sample volumes larger than 400 μL are required, use of QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits is recommended; these can process up to 2 mL or up to 10 mL of sample, respectively.

Note: Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

4. Incubate at 56°C for 10 min.

DNA yield reaches a maximum after lysis for 10 min at 56°C. Longer incubation times have no effect on yield or quality of the purified DNA.

5. Briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.
6. Add 200 μ L ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

If the sample volume is greater than 200 μ L, increase the amount of ethanol proportionally; for example, a 400 μ L sample will require 400 μ L of ethanol.

7. Carefully apply the mixture from step 6 to the QIAamp Mini spin column (in a 2 mL collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.

Close each spin column to avoid aerosol formation during centrifugation.

Centrifugation is performed at 6000 \times g (8000 rpm) to reduce noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the lysate has not completely passed through the column after centrifugation, centrifuge again at higher speed until the QIAamp Mini spin column is empty.

Note: When preparing DNA from buffy coat or lymphocytes, centrifugation at full speed is recommended to avoid clogging.

8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 μ L Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.

It is not necessary to increase the volume of Buffer AW1 if the original sample volume is larger than 200 μ L.

Note: Flow through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

9. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 μL Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 $\times g$; 14,000 rpm) for 3 min.
10. **Recommended:** Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 mL collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

11. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 200 μL Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min, and then centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp Mini spin column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

A second elution step with a further 200 μL Buffer AE will increase yields by up to 15%.

Volumes of more than 200 μL should not be eluted into a 1.5 mL microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation.

Elution with volumes of less than 200 μL increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces the overall DNA yield (see Table 5, page 36). For samples containing less than 1 μg of DNA, elution in 50 μL Buffer AE or water is recommended. Eluting with 2 \times 100 μL instead of 1 \times 200 μL does not increase elution efficiency.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and storing at -30°C to -15°C is recommended, because DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

A 200 μL sample of whole human blood (approximately 5×10^6 leukocytes/mL) typically yields 6 μg of DNA in 200 μL water (30 ng/ μL) with an A_{260}/A_{280} ratio of 1.7–1.9.

For more information about elution and how to determine DNA yield, purity, and length, refer to Table 4 (page 36) and Appendix A (page 69).

Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Vacuum Protocol)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from whole blood, plasma, serum, lymphocytes, and body fluids using the QIAvac 24 Plus or equivalent vacuum manifold. For total DNA purification using a microcentrifuge, see “Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)” on page 37.

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- For setup of the QIAvac 24 Plus, see page 28.
- Switch off vacuum between steps to ensure that a consistent, even vacuum is applied during protocol steps.
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).
- A total of 200 µL of whole blood yields 3–12 µg of DNA.

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C for use in step 4.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Pipet 20 μL QIAGEN Protease (or proteinase K) into the bottom of a 1.5 mL microcentrifuge tube.
2. Add 200 μL sample to the microcentrifuge tube. Use up to 200 μL whole blood, plasma, serum, or body fluids, or up to 5×10^6 lymphocytes in 200 μL PBS.

If the sample volume is less than 200 μL , add the appropriate volume of PBS.

QIAamp Mini columns copurify RNA and DNA when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 μL of an RNase A stock solution (100 mg/mL) should be added to the sample before addition of Buffer AL.

Note: It is possible to add QIAGEN Protease (or proteinase K) to samples that have already been dispensed into microcentrifuge tubes. In this case, it is important to ensure proper mixing after adding the enzyme.

3. Add 200 μL Buffer AL to the sample. Mix by pulse-vortexing for 15 s.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

If the sample volume is larger than 200 μL , increase the amount of QIAGEN Protease (or proteinase K) and Buffer AL proportionally; for example, a 400 μL sample will require 40 μL QIAGEN Protease (or proteinase K) and 400 μL Buffer AL. If sample volumes larger than 400 μL are required, use of QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits is recommended; these can process up to 2 mL or up to 10 mL of sample, respectively.

Note: Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

4. Incubate at 56°C for 10 min.

DNA yield reaches a maximum after lysis for 10 min at 56°C. Longer incubation times have no effect on yield or quality of the purified DNA.

5. Briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.
6. Add 200 μL ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

If the sample volume is greater than 200 μL , increase the amount of ethanol proportionally; for example, a 400 μL sample will require 400 μL of ethanol.

7. Insert the QIAamp Mini column into the VacConnector on the QIAvac vacuum manifold. Carefully apply the mixture from step 6 to the QIAamp Mini column without wetting the rim. Switch on the vacuum pump. Be sure to leave the lid of the QIAamp Mini column open while applying vacuum. After all lysates have been drawn through the spin column, switch off the vacuum pump.

The collection tube from the blister pack can be saved for the centrifugation in step 10.

If at this stage all of the solution has not passed through the membrane, place the QIAamp Mini column into a clean 2 mL collection tube (provided), close the cap, and centrifuge at $6000 \times g$ (8000 rpm) for 3 min or until all the liquid has completely passed through. Place the QIAamp Mini column into another clean 2 mL collection tube, and discard the tube containing the filtrate. Continue with step 8 of the spin protocol on page 27.

Note: Flow through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

8. Apply 750 μL Buffer AW1 to the QIAamp Mini column without wetting the rim. Leave the lid of the QIAamp Mini column open and switch on the vacuum pump. After all of Buffer AW1 has been drawn through the QIAamp Mini column, switch off the vacuum pump.

9. Add 750 μL Buffer AW2 without wetting the rim of the QIAamp Mini column. Leave the lid of the QIAamp Mini column open and switch on the vacuum pump. After all of Buffer AW2 has been drawn through the QIAamp Mini column, switch off the vacuum pump.
10. Close the lid of the QIAamp Mini column, remove it from the vacuum manifold, and discard the VacConnector. Place the QIAamp Mini column into a clean 2 mL collection tube and centrifuge at 20,000 $\times g$ (14,000 rpm) for 1 min to dry the membrane completely.
11. Place the QIAamp Mini column in a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini column. Add 200 μL Buffer AE or distilled water equilibrated to room temperature (15–25°C). Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp Mini column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

A second elution step with a further 200 μL Buffer AE will increase yields by up to 15%.

Volumes of more than 200 μL should not be eluted into a 1.5 mL microcentrifuge tube because the QIAamp Mini column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation.

Elution with volumes of less than 200 μL increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces overall DNA yield (see Table 5, page 36). For samples containing less than 1 μg of DNA, elution in 50 μL Buffer AE or water is recommended. Eluting with 2 \times 100 μL instead of 1 \times 200 μL does not increase elution efficiency.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and storing at -30°C to -15°C is recommended, since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

A 200 μL sample of whole human blood (approx. 5×10^6 leukocytes/mL) typically yields 6 μg of DNA in 200 μL water (30 ng/ μL) with an A_{260}/A_{280} ratio of 1.7–1.9.

For more information about elution and how to determine DNA yield, purity, and length, refer to Table 4 (page 36) and Appendix A (page 69).

Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from tissues using the QIAamp DNA Mini Kit.

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).
- Avoid repeated freezing and thawing of stored samples, since this leads to reduced DNA size.
- Transcriptionally active tissues, such as liver and kidney, contain high levels of RNA that will copurify with genomic DNA. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions but will not inhibit PCR. If RNA-free genomic DNA is required, include the RNase A digest, as described in step 5a of the protocol.

Things to do before starting

- Equilibrate the sample to room temperature (15–25°C).
- Heat two water baths or heating blocks: one to 56°C for use in step 3, and one to 70°C for use in step 5.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 16.
- If a precipitate has formed in Buffer ATL or Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Excise the tissue sample or remove it from storage. Determine the amount of tissue. Do not use more than 25 mg (10 mg spleen).

Weighing tissue is the most accurate way to determine the amount.

If DNA is prepared from spleen tissue, no more than 10 mg should be used.

The yield of DNA will depend on both the amount and the type of tissue processed. 1 mg of tissue will yield approximately 0.2–1.2 µg of DNA.

2. Cut up (step 2a), grind (step 2b), or mechanically disrupt (step 2c) the tissue sample. The QIAamp procedure requires no mechanical disruption of the tissue sample, but lysis time will be reduced if the sample is ground in liquid nitrogen (step 2b) or mechanically homogenized (step 2c) in advance.
 - a. Cut up to 25 mg of tissue (up to 10 mg spleen) into small pieces. Place in a 1.5 mL microcentrifuge tube, and add 180 µL of Buffer ATL. Proceed with step 3.

It is important to cut the tissue into small pieces to decrease lysis time. Microcentrifuge tubes (2 mL) may be better suited for lysis.

- b. Place up to 25 mg of tissue (10 mg spleen) in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into 1.5 mL microcentrifuge tube. Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw, and add 180 µL of Buffer ATL. Proceed with step 3.
- c. Add up to 25 mg of tissue (10 mg spleen) to a 1.5 mL microcentrifuge tube containing no more than 80 µL PBS. Homogenize the sample using the TissueRuptor or equivalent rotor–stator homogenizer. Add 100 µL Buffer ATL, and proceed with step 3.

Some tissues require undiluted Buffer ATL for complete lysis. In this case, grinding in liquid nitrogen is recommended. Samples cannot be homogenized directly in Buffer ATL, which contains detergent.

3. Add 20 μL proteinase K, mix by vortexing, and incubate at 56°C until the tissue is completely lysed. Vortex occasionally during incubation to disperse the sample, or place in a shaking water bath or on a rocking platform.

Note: Proteinase K must be used. QIAGEN Protease has reduced activity in the presence of Buffer ATL.

Lysis time varies depending on the type of tissue processed. Lysis is usually complete in 1–3 h. Lysis overnight is possible and does not influence the preparation. To ensure efficient lysis, a shaking water bath or a rocking platform should be used. If not available, vortexing 2–3 times per hour during incubation is recommended.

4. Briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.
5. If RNA-free genomic DNA is required, follow step 5a. Otherwise, follow step 5b.

Transcriptionally active tissues, such as liver and kidney, contain high levels of RNA that will copurify with genomic DNA. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions but will not inhibit PCR.

- a. First add 4 μL RNase A (100 mg/mL), mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate for 2 min at room temperature (15–25°C). Briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid before adding 200 μL Buffer AL to the sample. Mix again by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.

It is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL. In most cases it will dissolve during incubation at 70°C. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

- b. Add 200 μL Buffer AL to the sample, mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.

It is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

- c. A white precipitate may form on addition of Buffer AL, which in most cases will dissolve during incubation at 70°C. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.
6. Add 200 μL ethanol (96–100%) to the sample, and mix by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 mL microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.

It is essential that the sample, Buffer AL, and the ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form on addition of ethanol. It is essential to apply all of the precipitate to the QIAamp Mini spin column. This precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

Do not use alcohols other than ethanol because this may result in reduced yields.

7. Carefully apply the mixture from step 6 (including the precipitate) to the QIAamp Mini spin column (in a 2 mL collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.

Note: Flow through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach.

Close each spin column to avoid aerosol formation during centrifugation.

It is essential to apply all of the precipitate to the QIAamp Mini spin column.

Centrifugation is performed at 6000 x g (8000 rpm) to reduce noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the solution has not completely passed through the membrane, centrifuge again at a higher speed until all the solution has passed through.

- Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µL Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.

Note: Flow through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach.

- Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µL Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min.
- Recommended:** Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 mL collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

- Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 200 µL Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.
- Repeat step 11.

A 5 min incubation of the QIAamp Mini spin column loaded with Buffer AE or water, before centrifugation, generally increases DNA yield.

A third elution step with a further 200 µL Buffer AE will increase yields by up to 15%.

Volumes of more than 200 μL should not be eluted into a 1.5 mL microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation.

Elution with volumes of less than 200 μL increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces the overall DNA yield (see Table 5, page 36). Eluting with 4 x 100 μL instead of 2 x 200 μL does not increase elution efficiency.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and placing at -30°C to -15°C is recommended, since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

Yields of DNA will depend both on the amount and the type of tissue processed. 25 mg of tissue will yield approximately 10–30 μg of DNA in 400 μL of water (25–75 $\text{ng}/\mu\text{L}$), with an A_{260}/A_{280} ratio of 1.7–1.9.

For more information about elution and how to determine DNA yield, length, and purity, refer to Table 4 (page 36) and Appendix A (page 69).

Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from buccal swabs using a microcentrifuge. For total DNA purification using a vacuum manifold, see “Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Vacuum Protocol)” on page 57.

Important points before starting

- Due to the increased volume of Buffer AL that is required for the buccal swab protocol, fewer preparations can be performed. Additional Buffer AL can be purchased separately.
- This protocol is recommended for the following swab types: C.E.P. (Omni Swabs from Whatman Bioscience, www.whatman.com), cotton, and DACRON (Daigger, Puritan® applicators with plastic stick and cotton or DACRON tip from Hardwood Products Company, www.hwppuritan.com, or from Hain Diagnostika, www.hain-diagnostika.de).
- To collect a sample, scrape the swab firmly against the inside of each cheek six times. Air-dry the swab for at least 2 hour after collection. Ensure that the person providing the sample has not consumed any food or drink in the 30 minutes prior to sample collection.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).

Things to do before starting

- Prepare a 56°C water bath for use in step 3.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature (15–25°C) for elution in step 10.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Place buccal swab in a 2 mL microcentrifuge tube. Add 400 μ L (cotton and DACRON swab) or 600 μ L (Omni Swab) PBS to the sample.

The Omni Swab is ejected into the microcentrifuge tube by pressing the stem end toward the swab. Cotton or DACRON swabs are separated from the stick by hand or with scissors.

QIAamp Mini spin columns copurify RNA and DNA in parallel when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 μ L of an RNase A stock solution (100 mg/mL) should be added to the sample prior to the addition of Buffer AL.

2. Add 20 μ L QIAGEN Protease stock solution (or proteinase K) and 400 μ L (cotton or DACRON swab) or 600 μ L (Omni Swab) Buffer AL to the sample. Mix immediately by vortexing for 15 s.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed immediately and thoroughly.

Note: Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

3. Incubate at 56°C for 10 min. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

4. Add 400 μL (cotton or DACRON swab) or 600 μL (Omni Swab) ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by vortexing. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.
5. Carefully apply 700 μL of the mixture from step 4 to the QIAamp Mini spin column (in a 2 mL collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.

Close each spin column to avoid aerosol formation during centrifugation.

6. Repeat step 5 by applying up to 700 μL of the remaining mixture from step 4 to the QIAamp Mini spin column.
7. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 μL Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.
8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 μL Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 $\times g$; 14,000 rpm) for 3 min.
9. **Recommended:** Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 mL collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

10. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 150 μL Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min, and then centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min.

Elution with 100 μL buffer increases the final DNA concentration in the eluate significantly but may slightly reduce the overall DNA yield. Elution with volumes of less than 100 μL is not recommended as the overall DNA yield decreases dramatically.

A second elution step with the same 150 μL eluate containing the DNA will increase yield significantly. However this is not recommended when using the eluate for PCR.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and placing at -30°C to -15°C is recommended.

One buccal swab typically yields 0.5–3.5 μg of DNA in 150 μL of buffer (3–23 $\text{ng}/\mu\text{L}$), with A_{260}/A_{280} ratios of 1.7–1.9 (measured in water).

Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Vacuum Protocol)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from buccal swabs using the QIAvac 24 Plus or equivalent vacuum manifold. For total DNA purification using a microcentrifuge, see “Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol)” on page 53.

Important points before starting

- Due to the increased volume of Buffer AL that is required for the buccal swab protocol, fewer preparations can be performed. Additional Buffer AL can be purchased separately.
- This protocol is recommended for the following swab types: C.E.P. (Omni Swabs from Whatman Bioscience, www.whatman.com), cotton, and DACRON (Daigger, Puritan applicators with plastic stick and cotton or DACRON tip from Hardwood Products Company, www.hwppuritan.com, or from Hain Diagnostika, www.hain-diagnostika.de).
- To collect a sample, scrape the swab firmly against the inside of each cheek six times. Air-dry the swab for at least 2 hours after collection. Ensure that the person providing the sample has not consumed any food or drink in the 30 minutes prior to sample collection.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- For setup of the QIAvac 24 Plus, see page 28.
- Switch off the vacuum between steps to ensure that a consistent, even vacuum is applied during protocol steps.

Things to do before starting

- Prepare a 56°C water bath for use in step 3.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature (15–25°C) for elution in step 10.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Place buccal swab in a 2 mL microcentrifuge tube. Add 400 µL (cotton and DACRON swab) or 600 µL (Omni Swab) PBS to the sample.

The Omni Swab is ejected into the microcentrifuge tube by pressing the stem end toward the swab. Cotton or DACRON swabs are cut from the stick by hand or with scissors.

QIAamp Mini columns copurify RNA and DNA in parallel when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not the PCR itself. If RNA-free genomic DNA is required, 4 µL RNase A stock solution (100 mg/mL) should be added to the sample prior to the addition of Buffer AL.

2. Add 20 µL QIAGEN Protease stock solution (or proteinase K) and 400 µL (cotton or DACRON swab) or 600 µL (Omni Swab) of Buffer AL to the sample. Mix immediately by vortexing for 15 s.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed immediately.

Note: Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

3. Incubate at 56°C for 10 min. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

4. Add 400 μL (cotton or DACRON swab) or 600 μL (Omni Swab) ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by vortexing.
5. Insert the QIAamp Mini column into a VacConnector on the QIAvac vacuum manifold. Place an extension tube on the column. Seal unused Luer Adapters with Luer plugs.
6. Apply the mixture from step 4 to the QIAamp Mini column. Switch on the vacuum pump to draw the lysate through the QIAamp Mini column. After the lysate has passed through the QIAamp Mini column, switch off the vacuum pump.
7. Add 750 μL Buffer AW1 into the extension tube. Switch on the vacuum pump to draw Buffer AW1 through the QIAamp Mini column. Switch off the vacuum pump. Carefully remove the extension tube from the QIAamp Mini column and discard.
8. Add 750 μL Buffer AW2 without wetting the rim of the QIAamp Mini column. Leave the lid of the QIAamp Mini column open and switch on the vacuum pump. After all of Buffer AW2 has been drawn through the spin column, switch off the vacuum pump.
9. Close the lid of the QIAamp Mini column, remove it from the vacuum manifold, and discard the VacConnector. Place the QIAamp Mini column into a clean 2 mL collection tube and centrifuge at 20,000 $\times g$ (14,000 rpm) for 1 min to dry the membrane completely.
10. Place the QIAamp Mini column in a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Discard the collection tube and the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini column. Elute the DNA with 150 μL Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min, and then centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min.

Elution with 100 μL buffer increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but may slightly reduce the overall DNA yield. Elution with volumes of less than 100 μL is not recommended as overall DNA yield decreases dramatically.

A second elution step with the same 150 μL eluate containing the DNA will increase yield significantly. However this is not recommended when using the eluate for PCR.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and placing at -30°C to -15°C is recommended.

One buccal swab typically yields 0.5–3.5 μg DNA in 150 μL buffer (3–23 $\text{ng}/\mu\text{L}$), with A_{260}/A_{280} ratios of 1.7–1.9 (measured in water).

Protocol: DNA Purification from Dried Blood Spots (QIAamp DNA Mini Kit)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from blood, both untreated and treated with anticoagulants, which has been spotted and dried on filter paper (Schleicher and Schuell 903).

Important point before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).

Things to do before starting

- Prepare an 85°C water bath for use in step 2, a 56°C water bath for use in step 3, and a 70°C water bath for use in step 4.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature (15–25°C) for elution in step 10.
- Ensure that Buffer AW1 and Buffer AW2 have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL or Buffer ATL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Place 3 punched-out circles from a dried blood spot into a 1.5 mL microcentrifuge tube and add 180 µL of Buffer ATL.

Cut 3 mm (1/8 inch) diameter punches from a dried blood spot with a single-hole paper puncher.
2. Incubate at 85°C for 10 min. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

3. Add 20 μL proteinase K stock solution. Mix by vortexing, and incubate at 56°C for 1 h. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

The addition of proteinase K is essential.

4. Add 200 μL Buffer AL to the sample. Mix thoroughly by vortexing, and incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed immediately and thoroughly.

Do not add proteinase K directly to Buffer AL.

A white precipitate may form when Buffer AL is added to the sample. In most cases, the precipitate will dissolve during incubation. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

5. Add 200 μL ethanol (96–100%) to the sample, and mix thoroughly by vortexing. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

It is essential that the sample and ethanol are mixed thoroughly.

6. Carefully apply the mixture from step 5 to the QIAamp Mini spin column (in a 2 mL collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at $6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.

Note: Flow through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach.

Close each QIAamp Mini spin column to avoid aerosol formation during centrifugation.

7. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 μL Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at $6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.

8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 μL Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 $\times g$; 14,000 rpm) for 3 min.
9. **Recommended:** Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 mL collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

10. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 150 μL Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min, and then centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min.

Three punched-out circles (3 mm diameter) typically yield 150 ng and 75 ng of DNA from anticoagulated and untreated blood, respectively. If the yield from untreated blood is not sufficient, use 6 circles per prep instead of 3.

The volume of the DNA eluate used in a PCR assay should not exceed 10%; for example, for a 50 μL PCR, add no more than 5 μL of eluate.

Troubleshooting Guide

This troubleshooting guide may be helpful in solving any problems that may arise. For more information, see also the Frequently Asked Questions page at our Technical Support Center: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. The scientists in QIAGEN Technical Services are always happy to answer any questions you may have about either the information and protocols in this handbook or sample and assay technologies (for contact information, see back cover or visit www.qiagen.com).

Comments and suggestions

Colored residues remain on the QIAamp Mini spin column after washing

| | |
|--|---|
| Inefficient cell lysis due to insufficient mixing of the sample with Buffer AL | Repeat the DNA purification procedure with a new sample. Be sure to mix the sample and Buffer AL immediately and thoroughly by pulse-vortexing. |
|--|---|

| | |
|---|---|
| Inefficient cell lysis due to decreased protease activity | Repeat the DNA purification procedure with a new sample and with freshly prepared QIAGEN Protease stock solution. Be sure to store the stock solution at 2–8°C immediately after use. Ensure that QIAGEN Protease is not added directly to Buffer AL. |
|---|---|

| | |
|---|--|
| No ethanol added to the lysate before loading onto the QIAamp Mini column | Repeat the purification procedure with a new sample. |
|---|--|

| | |
|--|--|
| Buffer AW1 or AW2 prepared incorrectly | Ensure that Buffer AW1 and AW2 concentrates were diluted with the correct volumes of pure ethanol (see page 23). Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone. Repeat the purification procedure with a new sample. |
|--|--|

Little or no DNA in the eluate

| | |
|---|--|
| Low concentration of cells or viruses in the sample | Concentrate a larger volume of a new cell-free sample to 200 µL using a Centricon® 100 (Amicon, USA). Repeat the DNA purification procedure, adding 5–10 µg of carrier DNA to each lysate (see page 24) if the sample has a low DNA content. If whole blood was used, prepare buffy coat (see procedure on page 26). |
|---|--|

Comments and suggestions

| | |
|--|---|
| Inefficient cell lysis due to insufficient mixing with Buffer AL | Repeat the DNA purification procedure with a new sample. Be sure to mix the sample and Buffer AL immediately and thoroughly by pulse-vortexing. |
| Inefficient cell lysis due to decreased protease activity | Repeat the DNA purification procedure with a new sample and with freshly prepared QIAGEN Protease stock solution. Be sure to store the stock solution at 2–8°C immediately after use. Ensure that QIAGEN Protease is not added directly to Buffer AL. |
| Inefficient cell lysis or protein degradation in Buffer AL or Buffer ATL due to insufficient incubation time | Repeat the procedure with a new sample. Ensure that the tissue sample is cut into small pieces and extend the incubation time. Ensure that no residual particulates are visible (bones or hair will not be lysed at all). |
| Inefficient cell lysis due to decreased protease activity | Repeat the DNA purification procedure with a new sample and with freshly prepared QIAGEN Protease stock solution. Be sure to store the stock solution at 2–8°C immediately after use. Ensure that QIAGEN Protease is not added directly to Buffer AL. |
| No ethanol added to the lysate before loading onto the QIAamp Mini column | Repeat the purification procedure with a new sample. |
| Low-percentage ethanol used instead of 100% | Repeat the purification procedure with a new sample. Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone. |
| Isopropanol used instead of ethanol with samples other than blood or plasma | We strictly recommend the use of ethanol with all samples other than blood or plasma (serum). The use of isopropanol results in reduced yields with all other samples. |
| QIAamp Mini column not incubated at room temperature (15–25°C) for 1 min | After addition of Buffer AE or water, the QIAamp Mini column should be incubated at room temperature for at least 1 min. |
| DNA not eluted efficiently | To increase elution efficiency, pipet Buffer AE or water onto the center of the QIAamp Mini column and incubate the column for 5 min at room temperature before centrifugation. |
| pH of water incorrect (acidic) | Low pH may reduce DNA yield. Ensure that the pH of the water is at least 7.0 or use Buffer AE for elution. |

Comments and suggestions

| | |
|---|--|
| Buffer AW1 or AW2 prepared incorrectly | Check that Buffer AW1 and AW2 concentrates were diluted with the correct volumes of pure ethanol (see page 23). Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone. Repeat the purification procedure with a new sample. |
| Buffer AW1 or AW2 prepared with 70% ethanol | Check that Buffer AW1 and AW2 concentrates were diluted with 96–100% ethanol. Repeat the purification procedure with a new sample. |
| Buffers AW1 and AW2 used in the wrong order | Ensure that Buffers AW1 and AW2 are used in the correct order in the protocol. Repeat the purification procedure with a new sample. |
| Elution with too much Buffer AE | Elution with volumes of less than 200 µL increases the final DNA concentration in the eluate, but slightly reduces the overall DNA yield (see Table 5 on page 36). For samples containing less than 1 µg of DNA, elution in 50 µL of Buffer AE or water is always recommended. |

A₂₆₀/A₂₈₀ ratio for purified nucleic acids is low

| | |
|--|---|
| Inefficient cell lysis due to insufficient mixing with Buffer AL | Repeat the procedure with a new sample. Be sure to mix the sample and Buffer AL immediately and thoroughly by pulse-vortexing. |
| Inefficient cell lysis due to decreased protease activity | Repeat the DNA purification procedure with a new sample and with freshly prepared QIAGEN Protease stock solution. Be sure to store the stock solution at 2–8°C immediately after use. Ensure that QIAGEN Protease is not added directly to Buffer AL. |
| Inefficient cell lysis or protein degradation in Buffer AL or Buffer ATL due to insufficient incubation time | Repeat the procedure with a new sample. Extend the incubation time. Take care that no residual particulates are visible (bones or hair will not be lysed at all). |
| No ethanol added to the lysate before loading onto the QIAamp Mini column | Repeat the purification procedure with a new sample. |
| Low percentage ethanol used instead of 100% | Repeat the purification procedure with a new sample. |
| Buffer AW1 or AW2 prepared incorrectly | Check that Buffer AW1 and AW2 concentrates were diluted with the correct volumes of pure ethanol (see page 23). Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone. Repeat the purification procedure with a new sample. |

Comments and suggestions

| | |
|---|---|
| Buffer AW1 or AW2 prepared with 70% ethanol | Check that Buffer AW1 and AW2 concentrates were diluted with 96–100% ethanol. Repeat the purification procedure with a new sample. |
| Buffers AW1 and AW2 used in the wrong order | Ensure that Buffers AW1 and AW2 are used in the correct order in the protocol. Repeat the purification procedure with a new sample. |

A₂₆₀/A₂₈₀ ratio for purified nucleic acids is high

| | |
|-------------------------------|--|
| High level of residual RNA | In future DNA preparations, use the optional RNase step included in the protocols. |
| Buffer AL added to the sample | Always add RNase A first and vortex when before addition of RNase A using the optional RNase A step. |

DNA does not perform well in subsequent enzymatic reactions

| | |
|--|--|
| Not enough DNA in sample | <p>Check “Little or no DNA in the eluate” in this troubleshooting guide for possible reasons. Increase the amount of eluate added to the reaction, if possible. If necessary, vacuum-concentrate the DNA or increase the amount of sample used, and repeat the purification procedure. If the amount of purified DNA is still expected to be low, reduce the elution volume to 50 µL.</p> <p>Lowering the elution volume will slightly reduce the overall yield, but will result in a higher concentration of nucleic acids in the eluate (see Table 5 on page 36). DNA remaining on the QIAamp Mini column can be recovered in a subsequent elution step by applying the same eluate to the column.</p> |
| Inhibitory substances in preparation | Check “A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio for purified nucleic acids is low” for possible reasons |
| Residual Buffer AW2 in the eluate | Use recommended drying step in the relevant protocol. Ensure that the QIAamp Mini column does not come into contact with the filtrate prior to elution. |
| Buffers AW1 and AW2 used in the wrong order | Ensure that Buffers AW1 and AW2 are used in the correct order in the protocol. Repeat the purification procedure with a new sample. |
| High level of residual RNA | In future DNA preparations, use the optional RNase step included in the protocols. |
| Reduced sensitivity of amplification reaction | Adjust the volume of eluate added as template in the amplification reaction. Reoptimize the amplification system by adjusting the volume of eluate added. |
| Amplification reaction setup has been modified | Reoptimize the amplification system by adjusting the volume of eluate added. |

Comments and suggestions

White precipitate in Buffer ATL or Buffer AL

White precipitate may form after storage at low temperature or prolonged storage

Any precipitate in Buffer ATL or Buffer AL must be dissolved by incubation of the buffer at 56°C. The precipitate has no effect on function. Dissolving the precipitate at high temperature will not compromise yield or quality of the purified nucleic acids.

White precipitate in steps 5 or 6 of the tissue protocol

White precipitate may form after storage at low temperature or prolonged storage

In most cases the precipitate formed in step 5 will dissolve during incubation at 70°C. The precipitates do not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

General handling

Lysate not completely passed through the membrane

Using spin protocol: Centrifuge for 1 min at through the membrane full speed or until all the lysate has passed through the membrane.

Using vacuum protocol: Insufficient vacuum was applied or the lid of the QIAamp Mini column was closed during the vacuum step. Increase the vacuum, and open the lid while applying the vacuum. If the vacuum pressure cannot be increased, place the QIAamp Mini column in a clean 2 mL collection tube, close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 3 min or until the lysate has completely passed through the membrane. Place the QIAamp Mini column into another clean 2 mL collection tube, and discard the tube containing the filtrate. Continue with step 8 of the spin protocol on page 37.

Clogged membrane

Blood samples: Concentration of leukocytes in samples was greater than $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$. Dilute the sample with PBS and repeat the purification.

Plasma samples: Cryoprecipitates have formed in plasma due to repeated freezing and thawing. Do not use plasma that has been frozen and thawed more than once.

Cross contamination between samples

To avoid cross-contamination when handling QIAamp Mini columns, read "Handling of QIAamp Mini columns" on page 26. Repeat the purification procedure with new samples.

Vacuum pressure too high/too low

Using a vacuum pressure that is too high may damage the QIAamp membrane. Using a vacuum pressure that is too low may cause reduced DNA yield and purity. Use a vacuum regulator to adjust the pressure to -800 to 900 mbar for all vacuum steps.

Appendix A: Determination of Concentration, Yield, Purity, and Length of DNA

Determination of concentration, yield, and purity

DNA yields are determined from the concentration of DNA in the eluate, measured by absorbance at 260 nm. Purity is determined by calculating the ratio of absorbance at 260 nm to absorbance at 280 nm. Pure DNA has an A_{260}/A_{280} ratio of 1.7–1.9. Absorbance readings at 260 nm should lie between 0.1 and 1.0 to be accurate. Sample dilution should be adjusted accordingly. Use elution buffer or water (as appropriate) to dilute samples and to calibrate the spectrophotometer. Measure the absorbance at 260 and 280 nm, or scan absorbance from 220–320 nm (a scan will show if there are other factors affecting absorbance at 260 nm). Both DNA and RNA are measured with a spectrophotometer. To measure only DNA, a fluorometer must be used.

Determination of DNA length

The length of genomic DNA can be determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) through an agarose gel. The DNA should be concentrated by alcohol precipitation and reconstituted by gentle agitation in approximately 30 μ L TE buffer, pH 8.0,* for at least 30 minutes at 60°C. Avoid drying the DNA pellet for more than 10 minutes at room temperature (15–25°C) since over-dried genomic DNA is very difficult to redissolve. Load 3–5 μ g DNA per well. Standard PFGE conditions are as follows:

- 1% agarose gel in 0.5x TBE electrophoresis buffer*
- Switch intervals: 5–40 s
- Run time: 17 h
- Voltage: 170 V

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles.

Appendix B: Protocol for Cultured Cells

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from cultured cells using a microcentrifuge.

Additional equipment and reagents required

- Phosphate buffered saline (PBS)*
- Equipment for harvesting cells. Depending on the method chosen, one or more of the following are required:
 - Microcentrifuge
 - Trypsin and culture media*
 - Cell scraper

Important points before starting

- Do not use more than 5×10^6 cells (with a normal set of chromosomes).
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

Things to do before starting

- Heat a water bath or heating block to 56°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature (15–25°C) for elution.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Harvest cells according to step a (for cells grown in suspension) or b (for cells grown in a monolayer).
 - a. Cells grown in suspension (do not use more than 5×10^6 cells with a normal set of chromosomes): Determine the number of cells. Centrifuge the appropriate number of cells for 5 min at $300 \times g$ in a 1.5 mL microcentrifuge tube. Remove the supernatant completely and discard, taking care not to disturb the cell pellet. Continue with step 2.
 - b. Cells grown in a monolayer (do not use more than 5×10^6 cells with a normal set of chromosomes): Cells grown in a monolayer can be detached from the culture flask by either trypsinization or using a cell scraper.

To trypsinize cells:

Determine the number of cells. Aspirate the medium and wash cells with PBS. Aspirate the PBS, and add 0.10–0.25% trypsin. After cells have detached from the dish or flask, collect them in medium and transfer the appropriate number of cells (do not use more than 5×10^6 cells with a normal set of chromosomes) to a 1.5 mL microcentrifuge tube. Centrifuge for 5 min at $300 \times g$. Remove the supernatant completely and discard, taking care not to disturb the cell pellet. Continue with step 2.

Using a cell scraper:

Detach cells from the dish or flask. Transfer the appropriate number of cells (do not use more than 5×10^6 cells with a normal set of chromosomes) to a 1.5 mL microcentrifuge tube and centrifuge for 5 min at $300 \times g$. Remove the supernatant completely and discard, taking care not to disturb the cell pellet. Continue with step 2.

2. Resuspend cell pellet in PBS to a final volume of 200 μ L.
3. Add 20 μ L QIAGEN Protease or proteinase K.
4. Continue with step 3 of "Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)", page 37.

Appendix C: Protocols for Bacteria

These protocols have been used successfully for bacteria such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Bordetella pertussis* from nasopharyngeal swabs; *Borrelia burgdorferi* from cerebrospinal fluid; and *Legionella pneumophila* from broncho-alveolar lavage. For other bacteria, follow the protocol for Gram-positive bacteria, especially other Gram-positive bacteria, which may be difficult to lyse.

For isolation of bacterial DNA from urine, either follow the protocol for biological fluids, or use the QIAamp Viral RNA Mini Kit. Urine contains numerous unidentified PCR inhibitors. Buffer AVL (included in the QIAamp Viral RNA Mini Kit) is the buffer of choice to destroy these inhibitors.

Some bacteria (particularly Gram-positive bacteria) require pre-incubation with specific enzymes such as lysozyme* or lysostaphin* (e.g., staphylococci) to lyse the rigid multilayered cell wall. In these cases the protocol for Gram-positive bacteria should be used.

Additional reagents required

- **For swabs:** Phosphate-buffered saline (PBS)* containing a common fungicide*
- **For Gram-positive and difficult-to-lyse bacteria:** 20 mg/mL lysozyme or 200 µg/mL lysostaphin solution in 20 mM Tris·Cl,* pH 8.0, 2 mM EDTA,* 1.2% Triton®*

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).
- Avoid repeated freezing and thawing of stored samples, since this leads to reduced DNA size.

Things to do before starting

- Equilibrate the sample to room temperature (15–25°C).
- Heat 2 water baths or heating blocks: one to 56°C and one to 70°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer ATL or Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Isolation of bacterial DNA from biological fluids

1. Pellet bacteria by centrifugation for 10 min at 5000 x g (7500 rpm).
2. Resuspend bacterial pellet in 180 µL Buffer ATL (supplied in the QIAamp DNA Mini Kit).
3. Follow the “Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit)” from step 3 (page 47).

Isolation of bacterial DNA from eye, nasal, pharyngeal, or other swabs*

1. Collect samples and place in 2 mL PBS containing a common fungicide. Incubate for several hours at room temperature (15–25°C).
2. Follow the biological fluids protocol above from step 1.

Isolation of genomic DNA from bacterial plate cultures

1. Remove bacteria from culture plate with an inoculation loop and suspend in 180 µL of Buffer ATL (supplied in the QIAamp DNA Mini Kit) by vigorous stirring.
2. Follow the “Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit)” from step 3 (page 47).

Isolation of genomic DNA from bacterial suspension cultures

1. Pipet 1 mL of bacterial culture into a 1.5 mL microcentrifuge tube, and centrifuge for 5 min at 5000 x g (7500 rpm).
2. Calculate the volume of the pellet or concentrate and add Buffer ATL (supplied in the QIAamp DNA Mini Kit) to a total volume of 180 µL.
3. Follow the “Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit)” from step 3 (page 47).

*See also “Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol)” on page 53.

Isolation of genomic DNA from Gram-positive bacteria

1. Pellet bacteria by centrifugation for 10 min at 5000 x g (7500 rpm).
2. Suspend bacterial pellet in 180 µL of the appropriate enzyme solution (20 mg/mL lysozyme or 200 µg/mL lysostaphin; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA; 1.2% Triton).
3. Incubate for at least 30 min at 37°C.
4. Add 20 µL proteinase K and 200 µL Buffer AL. Mix by vortexing.
5. Incubate at 56°C for 30 min and then for a further 15 min at 95°C.

Note: Extended incubation at 95°C can lead to some DNA degradation.

6. Centrifuge for a few seconds.
7. Follow the "Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol)" from step 6 (page 47).

Appendix D: Protocol for Yeast (e.g., Cultured *Candida* spp.)

Additional reagents required

- Sorbitol buffer (1 M sorbitol, 100 mM EDTA, 14 mM β -mercaptoethanol)*
- Zymolase or lyticase*

Important points before starting

- Lysis time and yield will vary from sample to sample depending on the cell number and species processed. A total of 3 mL of log-phase culture will yield approximately 15–25 μ g of DNA in 400 μ L of water (37–62 ng/ μ L), with an A_{260}/A_{280} ratio of 1.6–1.8.
- A third elution with 200 μ L of Buffer AE or water will increase yield.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).
- Avoid repeated freezing and thawing of stored samples, since this leads to reduced DNA size.

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

Things to do before starting

- Equilibrate the sample to room temperature (15–25°C).
- Heat three water baths or heating blocks: one to 30°C, one to 56°C, and one to 70°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer ATL or Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Grow yeast culture in YPD medium to an OD₆₀₀ of 10.
2. Harvest 3 mL of culture by centrifuging for 10 min at 5000 x g (7500 rpm).
3. Resuspend the pellet in 600 µL sorbitol buffer. Add 200 U zymolase or lyticase and incubate at 30°C for 30 min.
4. Pellet the spheroplasts by centrifuging for 5 min at 5000 x g (7500 rpm).
5. Resuspend the spheroplasts in 180 µL Buffer ATL (supplied in the QIAamp DNA Mini Kit).
6. Follow the “Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit)” from step 3 (page 47).

Appendix E: Protocols for Viral DNA

For simultaneous purification of viral DNA and RNA from plasma or serum, we recommend using the QIAamp MinElute Virus Vacuum Kit or the QIAamp MinElute Virus Spin Kit. These kits provide viral nucleic acid purification with minimal elution volumes for higher sensitivity in downstream applications. All buffers and components of these kits are guaranteed to be RNase free. Viral nucleic acid purification using the QIAamp MinElute Virus Spin Kit can be fully automated on the QIAcube for increased standardization and ease of use.

Important points before starting

- Stool, plasma, serum, urine, cerebrospinal fluid, and other body fluids often contain very low numbers of cells or viruses. In these cases, concentrating samples from up to 3.5 mL to a final volume of 200 μ L, as described in the “Appendix J: Protocol for Sample Concentration” on page 93, is recommended.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Integrated viral DNA

Integrated viral DNA is prepared by the same procedures as genomic DNA (see standard protocols).

Free viral DNA from fluids or suspensions

For preparation of DNA from free viral particles in fluids or suspensions (other than urine) using the “Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluid” protocols we recommend the addition of 1 μL of an aqueous solution containing 5–10 μg of carrier DNA (e.g., poly dA, poly dT, poly dA:dT)* to 200 μL Buffer AL.

To ensure binding conditions are optimal, increase the volume of ethanol added at step 6 from 200 to 230 μL .

Elution should be in 60 μL Buffer AE.

Free viral DNA from stool

Additional equipment and reagents required

- 0.89% saline solution
- 0.22 μm filter

Procedure

1. Suspend 0.5–1.0 mL of a stool specimen in not more than 5 mL of 0.89% NaCl (maximum dilution 1:10).
2. Clarify the solution by centrifugation for 20 min at 4000 x *g*.
3. Filter supernatant through a 0.22 µm filter.

Filtration will remove cells from the sample, eliminating cellular DNA from the preparation.

4. Pipet 200 µL of the filtrate into a 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 20 µL QIAGEN Protease and continue with the “Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)” from step 3 (page 37).

Free viral DNA from eye, nasal, pharyngeal, or other swabs

Additional reagent required

- Phosphate-buffered saline (PBS) containing a common fungicide *

Procedure

- Collect samples and transfer to 2 mL PBS containing a common fungicide and bactericide. Incubate for 2–3 hours at room temperature (15–25°C).
- Concentrate the samples from 2 mL to 200 µL as described in the “Appendix J: Protocol for Sample Concentration” on page 93.
- Pipet 200 µL concentrate into a 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 20 µL QIAGEN Protease and continue with the “Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)” from step 3 (page 37).

Viral DNA from urine

- Use the QIAamp Viral RNA Mini Kit. Urine contains numerous unidentified PCR inhibitors. Buffer AVL (included in the QIAamp Viral RNA Mini Kit) is the buffer of choice to inactivate these inhibitors.
- Eluting the DNA in 50–100 µL elution buffer or water is recommended.

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

Appendix F: Protocols for Eye, Nasal, or Pharyngeal Swabs

Stool, plasma, serum, urine, cerebrospinal fluid, and other body fluids often contain very low numbers of cells or viruses. In these cases, concentrating samples from up to 3.5 mL to a final volume of 200 μ L, as described in the “Appendix J: Protocol for Sample Concentration” on page 93, is recommended.

DNA viruses

See “Appendix E: Protocols for Viral DNA” on page 80.

Bacteria

See “Appendix C: Protocols for Bacteria” on page 74.

Cells

Additional reagent required

- Phosphate-buffered saline (PBS) containing a common fungicide

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Collect samples and transfer into 2 mL PBS containing a common fungicide and bactericide. Incubate for 2–3 h at room temperature (15–25°C).
2. Concentrate the samples from 2 mL to 200 μ L as described in the “Appendix J: Protocol for Sample Concentration” on page 93. Alternatively pellet the cells by centrifuging for 10 min at 5000 \times *g* (7500 rpm).
3. Pipet 200 μ L concentrate into a 1.5 mL microcentrifuge tube. Alternatively resuspend the cell pellet in 200 μ L PBS. Add 20 μ L QIAGEN Protease and continue with the “Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)” from step 3 (page 37).

Eluting the DNA in 50–100 μ L of Buffer AE or water is recommended.

Appendix G: Protocol for Mitochondrial DNA from Platelets

Additional reagent required

- Due to the increased volumes of Buffer AL and QIAGEN Protease that are required for the following protocol, fewer preparations can be performed. Additional Buffer AL and QIAGEN Protease can be purchased separately.

Important point before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Draw blood in the presence of a common anticoagulant.
2. Take 8 mL of the blood and prepare platelet-rich plasma by centrifugation at 100 x g for 15 min at room temperature (15–25°C).

3. Transfer upper layer into a new tube and remove residual blood cells by centrifugation at 200 x g for 10 min at room temperature.
4. Transfer supernatant to a new tube.
5. Add 400 µL platelet suspension to a 1.5 mL microcentrifuge tube containing 40 µL QIAGEN Protease or proteinase K. Add 400 µL Buffer AL and mix thoroughly by vortexing.
6. Incubate at 56°C for 10 min. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.
7. Add 400 µL ethanol (96–100%), and mix again by vortexing. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.
8. Apply 620 µL of the lysate to the QIAamp Mini spin column (in a 2 mL collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.*
9. Apply the remainder of the lysate to the QIAamp Mini spin column without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube, and discard the tube containing the filtrate.
10. Continue with step 8 of the "Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)" (page 37).

Eluting the DNA in 50–100 µL of Buffer AE or water is recommended.

*Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

Appendix H: Protocol for CSF and Bone Marrow on Hematological Slides

Additional equipment and reagents required

- Phosphate-buffered saline (PBS)
- Clean microscope slide

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 23.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Moisten the dried material with a drop of PBS.
2. Add 180 μL PBS to a 1.5 mL microcentrifuge tube.
3. Scrape cytological material into the microcentrifuge tube using the edge of a clean slide.
4. Dissolve the resulting sludge by pipetting up and down.
5. Add 20 μL QIAGEN Protease and continue with the "Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)" from step 3 (page 37).

Appendix I: Protocol for Crude Cell Lysates and Other Samples

For preparation of genomic DNA from samples other than those listed in this handbook or for which specialized protocols are not available, the following procedure is recommended.

QIAGEN is continuously developing and optimizing QIAamp protocols for new sample sources not included in this handbook. Additional preliminary protocols developed by customers are available for bone, hair, nails, sperm, fungi, and many other sample types. Please contact one of our Technical Service Departments or your local distributor (see back cover or visit www.qiagen.com) for more information.

Additional reagent required

- Cell lysis buffer*

Important points before starting

- Optimal lysis conditions must first be found for the specific sample being processed. QIAamp lysis buffers are not suitable for all sample sources.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 24).

*When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles.

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 37.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Lyse sample in the sample-specific lysis buffer in as small a volume as possible (200 µL of lysis buffer is optimal).
2. Estimate the volume of the lysate.
3. Add 20 µL proteinase K per 200 µL lysate.
4. Add 200 µL Buffer AL per 200 µL lysate.
5. Mix immediately by pulse-vortexing for 15 s.
6. Incubate at 56°C for 10 min. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.
7. Check the pH of the lysate. The pH must be acidic (<7.0) to obtain maximum binding of DNA to the QIAamp membrane.
8. Add 200 µL ethanol (96–100%) per 200 µL lysate, and mix again by pulse-vortexing for 15 s. Briefly centrifuge to remove drops from inside the lid.

9. Apply 620 μL of the lysate to the QIAamp Mini spin column (in a 2 mL collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 $\times g$ (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 mL collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.*
10. Repeat step 9 until the whole lysate is loaded. A maximum of 5 \times 620 μL can be loaded onto the QIAamp Mini spin column.
11. Continue with step 8 of the "Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)" (page 37).

Note: Yields will vary from sample to sample depending on the cell number and species processed.

*Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach.

Appendix J: Protocol for Sample Concentration

Plasma, serum, urine, cerebrospinal fluid, and other body fluids often contain very low numbers of cells, bacteria, or viruses. In these cases, concentrating samples from up to 3.5 mL to a final volume of 200 μ L is recommended.

Additional equipment required

- Centrifugal microconcentrators such as Amicon[®] Centricon-100 (Millipore, 2 mL), Microsep 100 (Filtron, 3.5 mL), and UltraFree[®] CL (Millipore, 2 mL), or equivalents from other suppliers

Procedure

1. Apply up to 3.5 mL sample to the microconcentrator, according to manufacturer's instructions.
2. Centrifuge according to manufacturer's instructions to a final volume of 200 μ L.
3. It may not always be possible to concentrate samples to 200 μ L due to the high viscosity of the sample (e.g., plasma). In these cases, centrifugation for 6 h is recommended.
4. Pipet 200 μ L concentrate into a 1.5 mL microcentrifuge tube and follow the appropriate QIAamp protocol for the specific sample.

Ordering Information

| Product | Contents | Cat. no. |
|---|--|----------|
| EZ2 RNA/miRNA Tissue/Cells Kit (48) | For 48 preps: EZ2 RNA/miRNA Tissue/Cells cartridge, Filter Tips and Holders, Tubes, RNase-free DNase, Buffer RLT, Proteinase K | 959035 |
| EZ2 Connect | Benchtop instrument for automated isolation of nucleic acids from up to 24 samples in parallel, using sealed prefilled cartridges; includes 1-year warranty on parts and labor | 9003210 |
| Accessories and reagents | | |
| Allprotect Tissue Reagent (100 mL) | For immediate stabilization of DNA, RNA, and protein in tissues | 76405 |
| RNAprotect Tissue Reagent (50 mL) | For stabilization of RNA in 25 x 200 mg tissue samples: 50 mL RNAprotect Tissue Reagent | 76104 |
| RNAprotect Tissue Reagent (250 mL) | For stabilization of RNA in 125 x 200 mg tissue samples: 250 mL RNAprotect Tissue Reagent | 76106 |
| RNAprotect Cell Reagent (250 mL) | 250 mL RNAprotect Cell Reagent | 76526 |
| Filter Tips and Holders, EZ1 (50) | 50 Disposable Filter-Tips, 50 Disposable Tip Holders; additional tips and holders for use with EZ1, EZ1&2 and EZ2 Kits | 994900 |
| QuantiTect Primer Assay (200) | Genome-wide, bioinformatically validated primer sets for use in SYBR Green-based real-time RT-PCR on any cyclor | 249900 |
| QuantiTect Reverse Transcription Kit (50) | For fast and convenient procedure for cDNA synthesis with integrated genomic DNA removal | 205311 |
| QIAshredder (50) | 50 disposable cell-lysate homogenizers for use in nucleic acid minipreps | 79654 |
| QIAshredder (250) | 250 disposable cell-lysate homogenizers for use in nucleic acid minipreps | 79656 |
| Instruments | | |
| TissueRuptor II | Handheld rotor–stator homogenizer, 5 TissueRuptor Disposable Probes | 9002755 |

| Product | Contents | Cat. no. |
|-----------------|--|----------|
| TissueLyser III | Bead mill with touch screen for simultaneous disruption of up to 192 samples | 9003240 |
| TissueLyser LT | Compact bead mill for simultaneous disruption of up to 12 samples | 85600 |

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. QIAGEN kit handbooks and user manuals are available at www.qiagen.com or can be requested from QIAGEN Technical Services or your local distributor.

Document Revision History

| Date | Changes |
|---------|--|
| 06/2023 | Added line under Ordering Info for QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit (240) (Cat. no. 51126) |
| 03/2024 | <ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="219 397 1020 445">• Added cat.no to kits, buffers accessories and enzymes. Updated references to kits. Removed one section in Appendix section.<li data-bbox="219 464 591 485">• Added Proteinase K in Kit Contents section.<li data-bbox="219 504 833 525">• Added kit compatibility with both QIAcube classic and QIAcube Connect<li data-bbox="219 544 958 564">• Added specific description on the functionality of QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit.<li data-bbox="219 584 1020 604">• Added specific description on the preinstalled protocol configurations of the QIAcube instruments. |
| 07/2025 | Corrected links of section all throughout the handbook. |

Limited License Agreement for QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit

Use of this product signifies the agreement of any purchaser or user of the product to the following terms:

1. The product may be used solely in accordance with the protocols provided with the product and this Instructions for Use and for use with components contained in the kit only. QIAGEN grants no license under any of its intellectual property to use or incorporate the enclosed components of this kit with any components not included within this kit except as described in the protocols provided with the product, this Instructions for Use, and additional protocols available at www.qiagen.com. Some of these additional protocols have been provided by QIAGEN users for QIAGEN users. These protocols have not been thoroughly tested or optimized by QIAGEN. QIAGEN neither guarantees them nor warrants that they do not infringe the rights of third-parties.
2. Other than expressly stated licenses, QIAGEN makes no warranty that this kit and/or its use(s) do not infringe the rights of third-parties.
3. This kit and its components are licensed for one-time use and may not be reused, refurbished, or resold.
4. QIAGEN specifically disclaims any other licenses, expressed or implied other than those expressly stated.
5. The purchaser and user of the kit agree not to take or permit anyone else to take any steps that could lead to or facilitate any acts prohibited above. QIAGEN may enforce the prohibitions of this Limited License Agreement in any Court, and shall recover all its investigative and Court costs, including attorney fees, in any action to enforce this Limited License Agreement or any of its intellectual property rights relating to the kit and/or its components.

For updated license terms, see www.qiagen.com.

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, FlexiGene®, Gentra®, Puregene®, InhibitEX®, MinElute®, TissueRuptor® (QIAGEN Group); Amicon®, Centricon®, UltraFree® (Merck KGaA); DACRON® (INVISTA North America S.A.R.L. Corporation); Puritan® (Puritan Medical Products Company); Triton® (Union Carbide Corp.); Tween® (ICI Americas Inc.). Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

07/2025 HB-0329-007 © 2025 QIAGEN, all rights reserved.


This page intentionally left blank

This page intentionally left blank

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека




В.Г. Акимкин

« 11 »  2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК

«РЕВЕРТА-L»

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 3 |
| НАЗНАЧЕНИЕ | 3 |
| ПРИНЦИП МЕТОДА | 3 |
| ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ..... | 3 |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ | 4 |
| СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ | 5 |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ..... | 5 |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА. ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА | 6 |
| СОСТАВ..... | 7 |
| ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ | 7 |
| СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ..... | 10 |
| ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ | 10 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ..... | 11 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

| | |
|--|--|
| ДНК | – дезоксирибонуклеиновая кислота |
| кДНК | – комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК |
| ПЦР | – полимеразная цепная реакция |
| РНК | – рибонуклеиновая кислота |
| ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора | – Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека |

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект реагентов **«РЕВЕРТА-L»** предназначен для получения кДНК на матрице РНК для последующего анализа методом полимеразной цепной реакции.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Получение кДНК на матрице РНК, экстрагированной из исследуемого биоматериала, проводится с помощью фермента обратной транскриптазы (ревертазы) и коротких олигонуклеотидов (гексамеров) случайной последовательности в качестве праймеров для полимеризации (рэндом-праймеры). В результате реакции обратной транскрипции синтезируется кДНК со всех РНК, присутствующих в исследуемом образце.

Обратная транскрипция РНК является преаналитическим этапом в клинической лабораторной диагностике.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ.

Комплект реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 50.

Форма 2 включает комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 100.

Форма 3 включает комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 100M.

Форма 4 включает комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 200M.

Форма 1: **REF** K3-4-50, **REF** K13-0051-50; Форма 2: **REF** K3-4-100, **REF** K13-0052-100;

Форма 3: **REF** K13-0053-100; Форма 4: **REF** K13-0054-200 / **VER** 11.05.21 / стр. 3 из 11

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) 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 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Комплект реагентов предназначен для одnorазового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

Комплект реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять комплект реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с комплектом реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать комплект реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать комплект реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать комплект реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности комплект реагентов безопасен.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности комплекта реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку¹, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БВВп-01-«Ламинар-С»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

¹ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan («СИА Биосан»), Латвия, или аналогичный) или амплификатор (например, MaxuGene Gradient (Axygen, Scientific Inc. («Эксиджен Саентифик, Инк»), США, или аналогичный).
3. Вортекс (например, SIA Biosan («СИА Биосан»), Латвия, или аналогичный).
4. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
5. Одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 0,2 (0,5) мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Штативы для пробирок объемом 0,2 (0,5) мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
8. Холодильник с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
10. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА. ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для проведения реакции обратной транскрипции служит раствор РНК, полученный ранее на этапе экстракции из исследуемого материала.

Информацию о порядке взятия, условиях транспортирования и хранения исследуемого материала, необходимости и порядке его подготовки к экстракции РНК, а также информацию об интерферирующих веществах и ограничениях, связанных с пробой, смотрите в инструкции к используемому набору реагентов для проведения амплификации.

СОСТАВ

«РЕВЕРТА-L» вариант 50 или вариант 100 – комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК – **включает:**

| Реагент | Описание | Вариант 50 | | Вариант 100 | |
|------------------|--------------------------------|------------|------------|-------------|-------------|
| | | Объем, мл | Кол-во | Объем, мл | Кол-во |
| RT-G-mix-1 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,01 | 5 пробирок | 0,01 | 10 пробирок |
| RT-mix | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,125 | 5 пробирок | 0,125 | 10 пробирок |
| Ревертаза (MMiv) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 1 пробирка | 0,06 | 1 пробирка |
| ДНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка | 1,2 | 2 пробирки |

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на проведение 60 реакций обратной транскрипции, включая контроли.

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на проведение 120 реакций обратной транскрипции, включая контроли.

«РЕВЕРТА-L» вариант 100М или вариант 200М – комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК – **включает:**

| Реагент | Описание | Вариант 100М | | Вариант 200М | |
|------------------|--------------------------------|--------------|------------|--------------|-------------|
| | | Объем, мл | Кол-во | Объем, мл | Кол-во |
| RT-G-mix-1 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,05 | 1 пробирка | 0,05 | 2 пробирки |
| RT-mix | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,25 | 5 пробирок | 0,25 | 10 пробирок |
| Ревертаза (MMiv) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,06 | 1 пробирка | 0,06 | 2 пробирки |
| ДНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 2 пробирки | 1,2 | 4 пробирки |

Комплект реагентов вариант 100М рассчитан на проведение 120 реакций обратной транскрипции, включая контроли.

Комплект реагентов вариант 200М рассчитан на проведение 240 реакций обратной транскрипции, включая контроли.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

(проводится в ЗОНЕ 2 - помещении для проведения ПЦР-амплификации).

Общий объем реакции – 20 мкл, объем РНК-пробы – 10 мкл.

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-

Форма 1: **REF** K3-4-50, **REF** K13-0051-50; Форма 2: **REF** K3-4-100, **REF** K13-0052-100;

Форма 3: **REF** K13-0053-100; Форма 4: **REF** K13-0054-200 / **VER** 11.05.21 / стр. 7 из 11

free».

ВНИМАНИЕ! Объем добавляемых реагентов и порядок проведения реакции могут быть различными. Необходимо руководствоваться описанием проведения реакции обратной транскрипции, указанным в инструкции к набору реагентов для выявления РНК анализируемого возбудителя.

Порядок работы:

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 (0,5) мл.
2. При использовании комплекта реагентов вариант 50 или вариант 100:
 - Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с **RT-mix** внести **5 мкл RT-G-mix-1**, тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
 - К полученному раствору добавить **6 мкл ревертазы (MMiv)**, пипетировать 5 раз, перемешать на вортексе. Осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
3. При использовании комплекта реагентов вариант 100M или вариант 200M:
 - Приготовить реакционную смесь на 24 реакции. Для этого в пробирку с **RT-mix** внести **10 мкл RT-G-mix-1**, тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
 - К полученному раствору добавить **12 мкл ревертазы (MMiv)**, пипетировать 5 раз, перемешать на вортексе. Осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
4. Внести в пробирки по **10 мкл** готовой реакционной смеси.
5. Используя наконечники с аэрозольным барьером, добавить по **10 мкл РНК-пробы** в пробирки с реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.
6. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) с температурой 37 °С на 30 мин.

Форма 1: **REF** K3-4-50, **REF** K13-0051-50; Форма 2: **REF** K3-4-100, **REF** K13-0052-100;

Форма 3: **REF** K13-0053-100; Форма 4: **REF** K13-0054-200 / **VER** 11.05.21 / стр. 8 из 11

7. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК для последующей постановки ПЦР развести в 2 раза ДНК-буфером (к **20 мкл кДНК** отдельным наконечником с аэрозольным барьером добавить **20 мкл ДНК-буфера**, аккуратно перемешать пипетированием 10 раз).

Готовый препарат кДНК можно хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 нед или при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Комплект реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Комплект реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

Хранение. Комплект реагентов хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик комплекта реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество комплекта реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru².

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению комплекта реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении комплекта реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.








Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

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



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ
от 01 сентября 2021 года № ФСР 2008/03994**

На медицинское изделие
**Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК "РЕВЕРТА-L"
по ТУ 9398-005-01897593-2008**

Настоящее регистрационное удостоверение выдано
**Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-
исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в
сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
(ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия,
111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А**

Производитель
**Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-
исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в
сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
(ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия,
111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А**

Место производства медицинского изделия
см.приложение

Номер регистрационного досье № РД-41825/34977 от 28.05.2021

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 2а

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической
деятельности 21.20.23.110

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе
приказом Росздравнадзора от 01 сентября 2021 года № 8354
допущено к обращению на территории Российской Федерации

**Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения**



Д.Ю. Павлюков

0058863

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 01 сентября 2021 года № ФСР 2008/03994

Лист 1

На медицинское изделие

**Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК "РЕВЕРТА-L"
по ТУ 9398-005-01897593-2008, в составе:**

Комплект реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 50, в составе:

- RT-G-mix-1 - 5 пробирок (0,01 мл);
- RT-mix - 5 пробирок (0,125 мл);
- Ревертаза (MMIv) - 1 пробирка (0,03 мл);
- ДНК-буфер - 1 пробирка (1,2 мл).

Форма 2 включает комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 100, в составе:

- RT-G-mix-1 - 10 пробирок (0,01 мл);
- RT-mix - 10 пробирок (0,125 мл);
- Ревертаза (MMIv) - 1 пробирка (0,06 мл);
- ДНК-буфер - 2 пробирки (1,2 мл).

Форма 3 включает комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 100М, в составе:

- RT-G-mix-1 - 1 пробирка (0,05 мл);
- RT-mix - 5 пробирок (0,25 мл);
- Ревертаза (MMIv) - 1 пробирка (0,06 мл);
- ДНК-буфер - 2 пробирки (1,2 мл).

Форма 4 включает комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 200М, в составе:

- RT-G-mix-1 - 2 пробирки (0,05 мл);
- RT-mix - 10 пробирок (0,25 мл);
- Ревертаза (MMIv) - 2 пробирки (0,06 мл);
- ДНК-буфер - 4 пробирки (1,2 мл).

Эксплуатационная документация:

- инструкция по применению - 1 шт;
- паспорт качества - 1 шт;
- краткое руководство - 1 шт.

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.

З

Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения



Д.Ю. Павлюков

0089002

Приказом Росздравнадзора
от 04.07.12г. № 2291-17п/13

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека



В.И.Покровский

12 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления генов металло- β -лактамаз групп VIM, IMP

и NDM методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® MDR MBL-FL»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 3 |
| НАЗНАЧЕНИЕ | 3 |
| ПРИНЦИП МЕТОДА | 3 |
| ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ..... | 4 |
| АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ..... | 5 |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ | 6 |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ..... | 7 |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА | 9 |
| ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК..... | 9 |
| ФОРМАТ FRT | 11 |
| СОСТАВ | 11 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 11 |
| ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ..... | 12 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»..... | 14 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации | 14 |
| Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» | 15 |
| АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ | 17 |
| СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ..... | 20 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1..... | 21 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ..... | 22 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

| | |
|--|---|
| БАЛ | - Бронхоальвеолярный лаваж |
| ВКО-FL | - Внутренний контрольный образец для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией |
| В– | - Отрицательный контроль экстракции |
| К+ | - Положительный контроль ПЦР |
| К– | - Отрицательный контроль ПЦР |
| МБЛ, MBL | - Металло-β-лактамазы |
| ОКО | - Отрицательный контрольный образец |
| ПКО | - Положительный контрольный образец |
| ПЦР | - Полимеразная цепная реакция |
| ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора | - Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека |
| MDR | - Полирезистентность (Multidrug-resistance) |
| FRT | - Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени» |

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® MDR MBL-FL» предназначен для выявления генов приобретенных карбапенемаз класса металло-β-лактамаз (МБЛ) групп VIM, IMP и NDM методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные путем экстракции из образцов чистой бактериальной культуры, положительной гемокультуры, смеси бактериальных культур, полученной путем первичного посева клинического материала (ликвора, БАЛ, раневого отделяемого и др.) на плотные или жидкие питательные среды, а также из образцов клинического материала: мочи, мазков со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.¹

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление фрагментов ДНК генов приобретенных металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

включает в себя два этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала и амплификацию фрагментов выявляемых генов МБЛ с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция ДНК из биологического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации при помощи специфичных праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Результаты амплификации фрагментов генов МБЛ групп VIM, IMP и NDM регистрируются по трем различным каналам флуоресцентной детекции: для группы VIM – по каналу для флуорофора FAM, для группы IMP – по каналу для флуорофора JOE, для группы NDM – по каналу для флуорофора Cy5. По каналу для флуорофора ROX детектируется продукт амплификации ДНК ВКО (внутреннего контрольного образца).

| Канал для флуорофора | FAM ² | JOE ² | ROX ² | Cy5 ² |
|----------------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|
| ДНК-мишень | гены МБЛ группы VIM | гены МБЛ группы IMP | ВКО | гены МБЛ группы NDM |

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 2 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

² Или аналогичный канал для детекции указанного флуорофора в зависимости от используемого прибора.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации фрагментов генов МБЛ групп VIM, IMP и NDM с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 2 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 2 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

| Вид биологического материала | Транспортная среда | Комплект/реагент для экстракции ДНК | Аналитическая чувствительность, копий/мл ³ |
|---|--|-------------------------------------|---|
| Гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем посева клинического материала на жидкую или плотную ⁴ питательную среду, | — | «ГК-экспресс» | 5x10 ⁵ |
| | | «ДНК-сорб-АМ» | 1x10 ⁵ |
| Моча | — | «ДНК-сорб-АМ» | 5x10 ² |
| | | «РИБО-преп» | |
| Мазки со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки | «Транспортная среда для мазков» или «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» | «ДНК-сорб-АМ» | 2x10 ³ |

С использованием данного набора реагентов были выявлены гены MBL соответствующих групп при анализе образцов ДНК контрольных штаммов, несущих гены известных MBL

³ Данная чувствительность достигается при соблюдении правил предварительной обработки образцов биоматериала, изложенных ниже, и рекомендуемом исследуемом объеме образца.

⁴ Для бактериальных культур, полученных путем посева на плотную питательную среду, указана чувствительность в отношении суспензии бактериальных клеток в реагенте «ГК-экспресс» или в лизирующем растворе «ДНК-сорб-АМ» соответственно.

следующих групп: VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-10, IMP-1, IMP-2, IMP-12, IMP-13.

Аналитическая специфичность

Отсутствовали неспецифические реакции при тестировании образцов ДНК человека и образцов ДНК следующих микроорганизмов: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Candida* spp.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена

предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Проведение предварительной подготовки исследуемого материала

1. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл

(например, Ахуген, США).

Проведение экстракции ДНК из исследуемых образцов

2. Комплект реагентов/реагент для выделения ДНК – «ДНК-сорб-АМ» (форма комплектации без контролей), «РИБО-преп», «ГК-экспресс» или другие комплекты, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов/реагенту для экстракции ДНК.

Проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-«Ламинар.-с», «Ламинарные системы», Россия).
5. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах (например, Ахуген, США).
8. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.
12. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), CFX96 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой –

- при использовании прибора планшетного типа;
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2010 г.

Материалом для исследования служат: положительная гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем первичного посева клинического материала (ликвора, БАЛ, раневого отделяемого, мочи и др.) на плотные или жидкие питательные среды, чистая бактериальная культура, а также образцы клинического материала: моча (при острых инфекциях мочевыводящих путей), мазки со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки (при проведении скрининга колонизации бактериями, обладающими приобретенными карбапенемазами).

Мазки со слизистых оболочек ротоглотки или прямой кишки должны быть помещены в транспортную среду «Транспортная среда для мазков» или «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем первичного посева клинического материала на жидкую питательную среду

Перенести от 0,1 до 0,25 мл гемокультуры или посева на среду обогащения в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл (с помощью одноразового шприца).

Центрифугировать 10 мин при 10 000 g (12 тыс об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf). Используя вакуумный

отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить надосадочную жидкость, не захватывая осадок и используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра.

Моча

Взболтать флакон с мочой. Перенести 1 мл мочи в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл, используя отдельный наконечник с фильтром для каждого образца. Центрифугировать 10 мин при 10 000 g (12 тыс об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf). При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова центрифугировать. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить надосадочную жидкость, не захватывая осадок и используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра.

С полученными после предварительной обработки образцами (осадками) провести процедуру экстракции ДНК в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Полученные после предварительной обработки образцы (осадки) можно хранить:

- при температуре не выше минус 16 °С – в течение недели,
- при температуре не выше минус 68 °С - длительно.

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов генов металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|----------------------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| ПЦР-смесь-1-FRT MBL | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |
| ПЦР-смесь-2-FRT | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,3 | 2 пробирки |
| Полимераза (TaqF) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 2 пробирки |
| К– | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| ПКО-1 MBL | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| ПКО-2 MBL | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|----------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |
| ВКО-FL | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,0 | 1 пробирка |

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению наборов реагентов для выявления генов карбапенемаз методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс®»

MDR MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR КРС/ОХА-48-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Таблица 1

Схема проведения ПЦР-исследования в зависимости от вида биологического материала

| Вид биологического материала | Объем для экстракции, мкл | Комплект/реагент для экстракции ДНК | Добавление ВКО-FL при экстракции | Программа амплификации | Используемый положительный контроль амплификации |
|--|---|-------------------------------------|----------------------------------|------------------------|--|
| Гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем посева клинического материала на жидкую питательную среду | Осадок из 100-250 мкл, полученный после предобработки | «ГК-экспресс» | – | «АмплиСенс-В» | ПКО-1 MBL |
| | | «ДНК-сорб-АМ» | + | «АмплиСенс-1» | ПКО-2 MBL |
| Смесь бактериальных культур, полученная путем посева клинического материала на плотную питательную среду | 10 ⁷ -10 ⁹ бактериальных клеток | «ГК-экспресс» | – | «АмплиСенс-В» | ПКО-1 MBL |
| | | «ДНК-сорб-АМ» | + | «АмплиСенс-1» | ПКО-2 MBL |
| Моча | Осадок из 1000 мкл, полученный после предобработки | «ДНК-сорб-АМ» | + | «АмплиСенс-1» | ПКО-2 MBL |
| | | «РИБО-преп» | | | |
| Мазки со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки | 100 | «ДНК-сорб-АМ» | + | «АмплиСенс-1» | ПКО-2 MBL |

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов / реагент:

- «ГК-экспресс» или «ДНК-сорб-АМ» для экстракции ДНК из образцов **положительной гемокультуры, смеси бактериальных культур, полученной при посеве на жидкую питательную среду (после предварительной обработки), образцов чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной при посеве на**

плотную питательную среду, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

- «ДНК-сорб-АМ» или «РИБО-преп» для экстракции ДНК из образцов **мочи** после предварительной обработки, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.
- «ДНК-сорб-АМ» для экстракции ДНК из образцов **мазков со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки** в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). В качестве пробы В- используется реактив ОКО. В случае использования для экстракции ДНК реагента «ГК-экспресс» добавление ВКО-FL в исследуемые образцы и ОКО в пробу В- не требуется.

При проведении экстракции ДНК из образцов, после предобработки представляющих собой осадки, лизирующий раствор или реагент «ГК-экспресс» добавляют непосредственно в пробирку с осадком, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.

При проведении экстракции из образцов чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной при посеве на плотную питательную среду, бактериальные клетки, взятые стерильной петлей (или стерильным наконечником) в количестве 10^7 - 10^9 клеток, помещают непосредственно в пробирку объемом 1,5 мл, содержащую реагент «ГК-экспресс» или лизирующий раствор набора «ДНК-сорб-АМ».

ВНИМАНИЕ! Не рекомендуется одновременно проводить экстракцию ДНК из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной путем посева на питательную среду, и из образцов биологического материала других видов, т.к. при этом существует высокий риск контаминации от образцов положительной гемокультуры или бактериальных культур, содержащих высокие концентрации ДНК возбудителя.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением эксперимента. Смешивать реагенты из расчета расходования на одну реакцию:

- **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT MBL,**
- **5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT,**
- **0,5 мкл полимеразы (TaqF).**

1. Предварительно необходимо подготовить смесь **ПЦР-смеси-2-FRT** и **полимеразы (TaqF)**. Содержимое одной пробирки с **полимеразой (TaqF) (30 мкл)** необходимо полностью перенести в пробирку с **ПЦР-смесью-2-FRT (300 мкл)** и аккуратно перемешать на центрифуге/вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на 60 реакций. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

В случае если данная смесь не может быть израсходована в течение трех месяцев, необходимо готовить смесь на меньшее количество реакций, например, смешать 150 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 15 мкл полимеразы (TaqF) (полученная смесь рассчитана на 30 реакций).

2. Перемешать содержимое пробирки с реагентом **ПЦР-смесь-1-FRT MBL** и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице, приведенной в приложении 1.**

Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку еще **3-х контрольных реакций: К+, К- и В-**.

Необходимо брать реагенты с запасом: для тестирования N образцов приготовить реагенты для (N+1) реакций.

3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-1-FRT MBL**, **ПЦР-смеси-2-FRT** с полимеразой (**TaqF**), приготовленной согласно п.1.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в пробирки по **15 мкл** готовой реакционной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл К-**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в одну пробирку внести **10 мкл ПКО-1 MBL** (при анализе проб ДНК, полученных из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, при использовании программы амплификации «АмплиСенс-В») или **10 мкл ПКО-2 MBL** (при анализе проб ДНК, полученных из образцов исходного клинического материала или из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, при использовании программы амплификации «АмплиСенс-1»).
 - в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В-)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала. При анализе проб ДНК, полученных при экстракции с помощью реагента «ГК-экспресс» из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной путем посева на

питательную среду, используется программа «АмплиСенс-В» (см. табл. 2). При анализе проб ДНК, полученных из образцов исходного клинического материала, или проб ДНК, полученных при экстракции с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ» из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, используется программа «АмплиСенс-1» (см. табл. 3).

Таблица 2

Программа «АмплиСенс-В»

| Цикл | Приборы роторного типа ⁵ | | | Приборы планшетного типа ⁶ | | |
|------|-------------------------------------|--|---------------|---------------------------------------|--|---------------|
| | Температура, °С | Время | Кол-во циклов | Температура, °С | Время | Кол-во циклов |
| 1 | 95 | 15 мин | 1 | 95 | 15 мин | 1 |
| 2 | 95 | 5 с | 35 | 95 | 5 с | 35 |
| | 60 | 20 с детекция флуоресц. сигнала | | 60 | 30 с детекция флуоресц. сигнала | |
| | 72 | 15 с | | 72 | 15 с | |

Таблица 3

Программа «АмплиСенс-1»

| Цикл | Приборы роторного типа ⁵ | | | Приборы планшетного типа ⁶ | | |
|------|-------------------------------------|--|---------------|---------------------------------------|--|---------------|
| | Температура, °С | Время | Кол-во циклов | Температура, °С | Время | Кол-во циклов |
| 1 | 95 | 15 мин | 1 | 95 | 15 мин | 1 |
| 2 | 95 | 5 с | 5 | 95 | 5 с | 5 |
| | 60 | 20 с | | 60 | 20 с | |
| | 72 | 15 с | | 72 | 15 с | |
| 3 | 95 | 5 с | 40 | 95 | 5 с | 40 |
| | 60 | 20 с детекция флуоресц. сигнала | | 60 | 30 с детекция флуоресц. сигнала | |
| | 72 | 15 с | | 72 | 15 с | |

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по четырем каналам – для флуорофоров FAM⁷, JOE⁷, ROX⁷ и Cy5⁷.

⁵ Например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁶ Например, CFX, iQ5 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁷ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют графики накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

- по каналу для флуорофора **FAM** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов **генов МБЛ группы VIM**;
- по каналу для флуорофора **JOE** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов **генов МБЛ группы IMP**;
- по каналу для флуорофора **ROX** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации **ДНК внутреннего контроля**;
- по каналу для флуорофора **Sy5** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов **генов МБЛ группы NDM**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения графика флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне экспоненциального подъема сигнала, что определяет наличие (или отсутствие) для данной ДНК-мишени значения порогового цикла *C_t* в соответствующей графе таблицы результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- **Гены МБЛ** соответствующей группы **обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM или/и JOE, или/и Sy5 определено значение порогового цикла *C_t*, не превышающее указанного граничного значения. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на

участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- **Гены МБЛ** соответствующей группы **не обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров FAM, JOE и Cy5 не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для исследуемого образца отсутствуют значения пороговых циклов C_t по каналам для флуорофоров FAM, JOE и Cy5, и по каналу для флуорофора ROX значение C_t также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае необходимо повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению наборов реагентов для выявления генов карбапенемаз методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MDR MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с таблицей 4 и вкладышем к набору реагентов.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Значение порогового цикла <i>Ct</i> | |
|----------|--------------------------------------|--|--|
| | | по каналам для флуорофоров FAM, JOE, Cy5 | по каналу для флуорофора ROX |
| В– | Экстракция ДНК | Значение отсутствует | Определено значение меньше граничного |
| К– | ПЦР | Значение отсутствует | Значение отсутствует |
| К+ | ПЦР | Определено значение меньше граничного | Не оценивается |

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значения порогового цикла по каналам для флуорофоров FAM, JOE, Cy5 отсутствуют или превышают указанное граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) регистрируется значение порогового цикла *Ct* по каналам для флуорофоров FAM или/и JOE, или/и Cy5, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла, соответственно, по каналам для флуорофоров FAM или/и JOE, или/и Cy5.

Клиническая интерпретация результатов теста должна проводиться врачом только при условии комплексного обследования пациента, с учетом данных анамнеза, клинического и эпидемиологического статуса, в соответствии с существующими клиническими и методическими рекомендациями.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

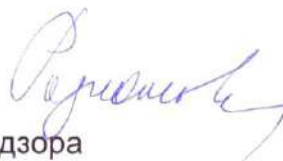
Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT MBL хранить в защищенном от света месте. ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® MDR MBL-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)⁸.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Директор НИИАХ ГБОУ ВПО СГМА
Минздрава России



Р.С. Козлов

⁸ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Схема приготовления реакционных смесей

| Объем реагентов на одну реакцию (мкл) | Объем реагентов на указанное количество реакций (мкл) | |
|---------------------------------------|---|--|
| | 10 мкл | 5 мкл |
| Количество исследуемых образцов* | ПЦР-смесь-1-FRT * | Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)* |
| 2 | 60 | 30 |
| 3 | 70 | 35 |
| 4 | 80 | 40 |
| 5 | 90 | 45 |
| 6 | 100 | 50 |
| 7 | 110 | 55 |
| 8 | 120 | 60 |
| 9 | 130 | 65 |
| 10 | 140 | 70 |
| 11 | 150 | 75 |
| 12 | 160 | 80 |
| 13 | 170 | 85 |
| 14 | 180 | 90 |
| 15 | 190 | 95 |
| 16 | 200 | 100 |
| 17 | 210 | 105 |
| 18 | 220 | 110 |
| 19 | 230 | 115 |
| 20 | 240 | 120 |
| 21 | 250 | 125 |
| 22 | 260 | 130 |
| 23 | 270 | 135 |
| 24 | 280 | 140 |
| 25 | 290 | 145 |

*Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки 3 контрольных реакций: K+, B- и K-.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

| | | | |
|--|----------------------------------|--|--|
|  | Номер в каталоге |  | Максимальное число тестов |
|  | Код партии |  | Использовать до |
|  | Изделие для in vitro диагностики |  | Обратитесь к руководству по эксплуатации |
|  | Дата изменения |  | Не допускать попадания солнечного света |
|  | Ограничение температуры |  | Дата изготовления |
|  | Производитель | | |



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 13 марта 2019 года № РЗН 2013/729

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления генов металло- β -лактамаз групп VIM, IMP и NDM методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс[®] MDR MBL-FL" по ТУ 9398-219-01897593-2012

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Производитель

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Место производства медицинского изделия

см. приложение

Номер регистрационного досье № РД-26106/11179 от 28.02.2019

Класс потенциального риска применения медицинского изделия **26**

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности **21.20.23.110**

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на листе

приказом Росздравнадзора от 13 марта 2019 года № 1976
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

**Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения**

Д.Ю. Павлюков

0042595



**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 13 марта 2019 года № РЗН 2013/729

Лист 1

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления генов металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® MDR MBL-FL" по ТУ 9398-219-01897593-2012:

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT.

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 2 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.



Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения

Д.Ю. Павлюков
0054113

Приказом Росздравнадзора
от 12.07.2013 № 3154-Пр/13

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека



В.И.Покровский
«03» 12 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления генов карбапенемаз групп KPC и OXA-48
в биологическом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] MDR KPC/OXA-48-FL»

АмплиСенс[®]



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 3 |
| НАЗНАЧЕНИЕ | 3 |
| ПРИНЦИП МЕТОДА | 3 |
| ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ..... | 4 |
| АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ..... | 5 |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ | 6 |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ..... | 8 |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА | 9 |
| ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК..... | 9 |
| ФОРМАТ FRT | 11 |
| СОСТАВ | 11 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 11 |
| ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ..... | 12 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»..... | 14 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации | 14 |
| Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» | 15 |
| АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 17 |
| СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ..... | 20 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1..... | 21 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ..... | 22 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

| | |
|--|---|
| БАЛ | - Бронхоальвеолярный лаваж |
| ВКО-FL | - Внутренний контрольный образец для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией |
| В- | - Отрицательный контроль экстракции |
| К+ | - Положительный контроль ПЦР |
| К- | - Отрицательный контроль ПЦР |
| ОКО | - Отрицательный контрольный образец |
| ПКО | - Положительный контрольный образец |
| ПЦР | - Полимеразная цепная реакция |
| ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора | - Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека |
| MDR | - Полирезистентность (Multidrug-resistance) |
| FRT | - Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени» |

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс[®] MDR КРС/ОХА-48-FL» предназначен для выявления генов приобретенных карбапенемаз групп КРС и ОХА-48-подобных (типы ОХА-48 и ОХА-162) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные путем экстракции из образцов чистой бактериальной культуры, положительной гемокультуры, смеси бактериальных культур, полученной путем первичного посева клинического материала (ликвора, БАЛ, раневого отделяемого и др.) на плотные или жидкие питательные среды, а также из образцов клинического материала: мочи, мазков со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.¹

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление фрагментов ДНК генов приобретенных карбапенемаз групп КРС и ОХА-48-подобных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя два этапа:

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

экстракцию ДНК из образцов биологического материала, амплификацию фрагментов выявляемых генов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция ДНК из биологического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации при помощи специфичных праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Результаты амплификации фрагментов генов карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных регистрируются по двум различным каналам флуоресцентной детекции: для группы KPC – по каналу для флуорофора FAM, для группы OXA-48-подобных – по каналу для флуорофора JOE. По каналу для флуорофора ROX детектируется продукт амплификации ДНК ВКО (внутреннего контрольного образца).

| Канал для флуорофора | FAM ² | JOE ² | ROX ² |
|----------------------|------------------------------|--|------------------|
| ДНК-мишень | Гены карбапенемаз группы KPC | Гены карбапенемаз группы OXA-48-подобных | ВКО |

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 2 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

² Или аналогичный канал для детекции указанного флуорофора в зависимости от используемого прибора.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации фрагментов генов карбапенемаз групп КРС и ОХА-48-подобных с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 2 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 2 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

| Вид биологического материала | Транспортная среда | Комплект/реагент для экстракции ДНК | Аналитическая чувствительность, копий/мл ³ |
|--|--|-------------------------------------|---|
| Гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем посева клинического материала на жидкую или плотную ⁴ питательную среду | - | «ГК-экспресс» | 5x10 ⁵ |
| | | «ДНК-сорб-АМ» | 1x10 ⁵ |
| Моча | - | «ДНК-сорб-АМ» | 5x10 ² |
| | | «РИБО-преп» | |
| Мазки со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки | «Транспортная среда для мазков» или «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» | «ДНК-сорб-АМ» | 2x10 ³ |

³ Данная чувствительность достигается при соблюдении правил предварительной обработки образцов биоматериала, изложенных ниже, и рекомендуемом объеме исследуемого образца.

⁴ Для бактериальных культур, полученных путем посева на плотную питательную среду, указана чувствительность в отношении суспензии бактериальных клеток в реагенте «ГК-экспресс» или в лизирующем растворе «ДНК-сорб-АМ», соответственно.

С использованием данного набора реагентов были выявлены гены карбапенемаз соответствующих групп при анализе образцов ДНК контрольных штаммов, несущих гены известных карбапенемаз типов KPC-3 и OXA-48.

Аналитическая специфичность

Отсутствовали неспецифические реакции при тестировании образцов ДНК человека и образцов ДНК следующих микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Candida* spp.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу

следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Проведение предварительной подготовки исследуемого материала

1. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Ахуген, США).

Проведение экстракции ДНК из исследуемых образцов

2. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-АМ», «РИБО-преп» или «ГК-экспресс» или другие комплекты, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов/реагенту для экстракции ДНК.

Проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

3. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-«Ламинар.-с», «Ламинарные системы», Россия).
4. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах (например, Ахуген, США).
7. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Емкость для сброса наконечников.
11. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX96 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
12. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:

- а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Axugen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2010 г.

Материалом для исследования служат положительная гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем первичного посева клинического материала (ликвора, БАЛ, раневого отделяемого, мочи и др.) на плотные или жидкие питательные среды, чистая бактериальная культура, а также образцы клинического материала: моча (при острых инфекциях мочевыводящих путей), мазки со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки (при проведении скрининга колонизации бактериями, обладающими приобретенными карбапенемазами).

Мазки со слизистых оболочек ротоглотки или прямой кишки должны быть помещены в транспортную среду «Транспортная среда для мазков» или «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

**Гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная
путем первичного посева клинического материала на
жидкую питательную среду**

Перенести от 0,1 до 0,25 мл гемокультуры или посева на среду обогащения в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл (с помощью одноразового шприца).

Центрифугировать 10 мин при 10000 g (12 тыс об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf). Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить надосадочную жидкость, не захватывая осадок и используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра.

Моча

Взболтать флакон с мочой. Перенести 1 мл мочи в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл, используя отдельный наконечник с фильтром для каждого образца. Центрифугировать 10 мин при 10000 g (12 тыс об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf). При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова центрифугировать. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить надосадочную жидкость, не захватывая осадок и используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра.

С полученными после предварительной обработки образцами (осадками) провести процедуру экстракции ДНК в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Полученные после предварительной обработки образцы (осадки) можно хранить:

- при температуре не выше минус 16 °С – в течение недели,
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов генов карбапенемаз групп КРС и ОХА-48-подобных с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|---------------------------------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| ПЦР-смесь-1-FRT КРС/ОХА-48 | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |
| ПЦР-смесь-2-FRT | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,3 | 2 пробирки |
| Полимераза (TaqF) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 2 пробирки |
| К– | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| ПКО-1 КРС/ОХА-48 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| ПКО-2 КРС/ОХА-48 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|----------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |
| ВКО-FL | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,0 | 1 пробирка |

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению наборов реагентов для выявления генов карбапенемаз методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MDR MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR КРС/ОХА-48-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Таблица 1

Схема проведения ПЦР-исследования в зависимости от вида биологического материала

| Вид биологического материала | Объем для экстракции, мкл | Комплект/реагент для экстракции ДНК | Добавление ВКО-FL при экстракции | Программа амплификации | Используемый положительный контроль амплификации |
|--|---|-------------------------------------|----------------------------------|------------------------|--|
| Гемокультура, смесь бактериальных культур, полученная путем посева клинического материала на жидкую питательную среду | Осадок из 100-250 мкл, полученный после предобработки | «ГК-экспресс» | – | «АмплиСенс-В» | ПКО-1 КРС/ОХА-48 |
| | | «ДНК-сорб-АМ» | + | «АмплиСенс-1» | ПКО-2 КРС/ОХА-48 |
| Смесь бактериальных культур, полученная путем посева клинического материала на плотную питательную среду | 10 ⁷ -10 ⁹ бактериальных клеток | «ГК-экспресс» | – | «АмплиСенс-В» | ПКО-1 КРС/ОХА-48 |
| | | «ДНК-сорб-АМ» | + | «АмплиСенс-1» | ПКО-2 КРС/ОХА-48 |
| Моча | Осадок из 1000 мкл, полученный после предобработки | «ДНК-сорб-АМ» | + | «АмплиСенс-1» | ПКО-2 КРС/ОХА-48 |
| | | «РИБО-преп» | | | |
| Мазки со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки | 100 | «ДНК-сорб-АМ» | + | «АмплиСенс-1» | ПКО-2 КРС/ОХА-48 |

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов / реагент:

- «ГК-экспресс» или «ДНК-сорб-АМ» для экстракции ДНК из образцов **положительной гемокультуры, смеси бактериальных культур, полученной при посеве на жидкую питательную среду**, после предварительной

обработки, образцов **чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной при посеве на плотную питательную среду** в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов/реагенту.

- «ДНК-сорб-АМ» или «РИБО-преп» для экстракции ДНК из образцов **мочи** после предварительной обработки в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.
- «ДНК-сорб-АМ» для экстракции ДНК из образцов **мазков со слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки** в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). В качестве пробы В– используется реактив ОКО. В случае использования для экстракции ДНК реагента «ГК-экспресс» добавления ВКО-FL в исследуемые образцы и ОКО в пробу В– не требуется.

При проведении экстракции ДНК из образцов, после предобработки представляющих собой осадки, лизирующий раствор или реагент «ГК-экспресс» добавляют непосредственно в пробирку с осадком, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.

При проведении экстракции из образцов чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной при посеве на плотную питательную среду, бактериальные клетки, взятые стерильной петлей (или стерильным наконечником) в количестве 10^7 - 10^9 клеток, помещают непосредственно в пробирку объемом 1,5 мл, содержащую реагент «ГК-экспресс» или лизирующий раствор набора «ДНК-сорб-АМ».

ВНИМАНИЕ! Не рекомендуется одновременно проводить экстракцию ДНК из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной путем посева на питательную среду, и из образцов биологического материала других видов, т.к. при этом существует высокий риск контаминации от образцов положительной гемокультуры или бактериальных культур, содержащих высокие концентрации ДНК возбудителя.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением эксперимента. Смешивать реагенты из расчета расходования на одну реакцию:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT КРС/ОХА-48,
- 5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT,
- 0,5 мкл полимеразы (TaqF).

1. Предварительно необходимо подготовить смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). Содержимое одной пробирки с полимеразой (TaqF) (30 мкл) необходимо полностью перенести в пробирку с ПЦР-смесью-2-FRT (300 мкл) и аккуратно перемешать на центрифуге/вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на 60 реакций. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

В случае если данная смесь не может быть израсходована в течение трех месяцев, необходимо готовить смесь на меньшее количество реакций, например, смешать 150 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 15 мкл полимеразы (TaqF) (полученная смесь рассчитана на 30 реакций).

2. Перемешать содержимое пробирки с реагентом ПЦР-смесь-1-FRT КРС/ОХА-48 и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно расчетной таблице, приведенной в приложении 1.

Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку еще **3-х контрольных реакций: К+, К- и В-**.

Необходимо брать реагенты с запасом: для тестирования N образцов приготовить реагенты для (N+1) реакций.

3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-1-FRT КРС/ОХА-48**, **ПЦР-смеси-2-FRT** с **полимеразой (TaqF)**, приготовленной согласно п.1.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в пробирки по **15 мкл** готовой реакционной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В-) –** внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.
 - б) **отрицательный контроль ПЦР (К-) –** внести в пробирку **10 мкл К-**.
 - в) **положительный контроль ПЦР (К+) –** в одну пробирку внести **10 мкл ПКО-1 КРС/ОХА-48** (при анализе проб ДНК, полученных из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, полученной путем посева на питательную среду, при использовании программы амплификации «АмплиСенс-В») или **10 мкл ПКО-2 КРС/ОХА-48** (при анализе проб ДНК, полученных из образцов исходного клинического материала или из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, при использовании программы амплификации «АмплиСенс-1»).

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала. При анализе проб ДНК, полученных при экстракции с помощью реагента «ГК-экспресс» из образцов гемокультуры, чистой культуры или

смеси бактериальных культур, полученной путем посева на питательную среду, используется программа «АмплиСенс-В» (см. табл. 2). При анализе проб ДНК, полученных из образцов исходного клинического материала, или проб ДНК, полученных при экстракции с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ» из образцов гемокультуры, чистой культуры или смеси бактериальных культур, используется программа «АмплиСенс-1» (см. табл. 3).

Таблица 2

Программа «АмплиСенс-В»

| Цикл | Приборы роторного типа ⁵ | | | Приборы планшетного типа ⁶ | | |
|------|-------------------------------------|--|---------------|---------------------------------------|--|---------------|
| | Температура, °С | Время | Кол-во циклов | Температура, °С | Время | Кол-во циклов |
| 1 | 95 | 15 мин | 1 | 95 | 15 мин | 1 |
| 2 | 95 | 5 с | 35 | 95 | 5 с | 35 |
| | 60 | 20 с детекция флуоресц. сигнала | | 60 | 30 с детекция флуоресц. сигнала | |
| | 72 | 15 с | | 72 | 15 с | |

Таблица 3

Программа «АмплиСенс-1»

| Цикл | Приборы роторного типа ⁵ | | | Приборы планшетного типа ⁶ | | |
|------|-------------------------------------|--|---------------|---------------------------------------|--|---------------|
| | Температура, °С | Время | Кол-во циклов | Температура, °С | Время | Кол-во циклов |
| 1 | 95 | 15 мин | 1 | 95 | 15 мин | 1 |
| 2 | 95 | 5 с | 5 | 95 | 5 с | 5 |
| | 60 | 20 с | | 60 | 20 с | |
| | 72 | 15 с | | 72 | 15 с | |
| 3 | 95 | 5 с | 40 | 95 | 5 с | 40 |
| | 60 | 20 с детекция флуоресц. сигнала | | 60 | 30 с детекция флуоресц. сигнала | |
| | 72 | 15 с | | 72 | 15 с | |

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по трем

⁵ Например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁶ Например, CFX, iQ5 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

каналам – для флуорофоров FAM⁷, JOE⁷ и ROX⁷.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют графики накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам:

- по каналу для флуорофора **FAM** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов **генов карбапенемаз группы KPC**;
- по каналу для флуорофора **JOE** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов **генов карбапенемаз группы OXA-48-подобных**;
- по каналу для флуорофора **ROX** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации **ДНК внутреннего контроля**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения графика флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне экспоненциального подъема сигнала, что определяет наличие (или отсутствие) для данной ДНК-мишени значения порогового цикла *C_t* в соответствующей графе таблицы результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- **Гены карбапенемаз** соответствующей группы **обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM и/или JOE определено значение порогового цикла *C_t*, не превышающее указанное граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать

⁷ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- **Гены карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных не обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров FAM и JOE не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для исследуемого образца отсутствуют значения пороговых циклов C_t по каналам для флуорофоров FAM и JOE, и по каналу для флуорофора ROX значение C_t также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае необходимо повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению наборов реагентов для выявления генов карбапенемаз методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс[®] MDR MBL-FL» и «АмплиСенс[®] MDR KPC/OXA-48-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с таблицей 4 и вкладышем к набору реагентов.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Значение порогового цикла <i>Ct</i> | |
|----------|--------------------------------------|--|--|
| | | по каналам для флуорофоров FAM, JOE | по каналу для флуорофора ROX |
| В- | Экстракция ДНК | Значение отсутствует | Определено значение меньше граничного |
| К- | ПЦР | Значение отсутствует | Значение отсутствует |
| К+ | ПЦР | Определено значение меньше граничного | Не оценивается |

Результат ПЦР-исследования считается недостоверным в следующих случаях:

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значения порогового цикла по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE отсутствуют или превышают указанное граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В-) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) регистрируется значение порогового цикла *Ct* по каналам для флуорофоров FAM или/и JOE, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла, соответственно, по каналам для флуорофоров FAM или/и JOE.

Клиническая интерпретация результатов теста должна проводиться врачом только при условии комплексного обследования пациента, с учетом данных анамнеза, клинического и эпидемиологического статуса, в соответствии с существующими клиническими и методическими рекомендациями.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT КРС/ОХА-48 хранить в защищенном от света месте. ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Рекламации на качество набора реагентов «**АмплиСенс® MDR КРС/ОХА-48-FL**» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)⁸.

Заведующий НПЛ ОмДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Директор НИИ антимикробной химиотерапии
ГБОУ ВПО СГМА Минздрава РФ



Р.С. Козлов

⁸ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Схема приготовления реакционных смесей

| | Объем реагентов на указанное количество реакций (мкл) | |
|---------------------------------------|---|--|
| Объем реагентов на одну реакцию (мкл) | 10 мкл | 5 мкл |
| Количество исследуемых образцов* | ПЦР-смесь-1-FRT * | Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)* |
| 2 | 60 | 30 |
| 3 | 70 | 35 |
| 4 | 80 | 40 |
| 5 | 90 | 45 |
| 6 | 100 | 50 |
| 7 | 110 | 55 |
| 8 | 120 | 60 |
| 9 | 130 | 65 |
| 10 | 140 | 70 |
| 11 | 150 | 75 |
| 12 | 160 | 80 |
| 13 | 170 | 85 |
| 14 | 180 | 90 |
| 15 | 190 | 95 |
| 16 | 200 | 100 |
| 17 | 210 | 105 |
| 18 | 220 | 110 |
| 19 | 230 | 115 |
| 20 | 240 | 120 |
| 21 | 250 | 125 |
| 22 | 260 | 130 |
| 23 | 270 | 135 |
| 24 | 280 | 140 |
| 25 | 290 | 145 |

*Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки 3 контрольных реакций: К+, В– и К–.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF

Номер в каталоге



Максимальное
число тестов

LOT

Код партии



Использовать до

IVD

Изделие для in vitro
диагностики



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации

VER

Дата изменения



Не допускать
попадания
солнечного света



Ограничение
температуры



Дата
изготовления



Производитель



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 13 марта 2019 года № РЗН 2013/879

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления генов карбапенемаз групп KPC и OXA-48 в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL" по ТУ 9398-220-01897593-2012

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиревская, д. 3А

Производитель

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиревская, д. 3А

Место производства медицинского изделия

см. приложение

Номер регистрационного досье № РД-26130/11190 от 01.03.2019

Класс потенциального риска применения медицинского изделия **2б**

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности **21.20.23.110**

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 13 марта 2019 года № 1974
допущено к обращению на территории Российской Федерации

**Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения**



Д.Ю. Павлюков

0042632

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 13 марта 2019 года № РЗН 2013/879

Лист 1

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления генов карбапенемаз групп KPC и OXA-48 в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс[®] MDR KPC/OXA-48-FL" по ТУ 9398-220-01897593-2012:

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT.

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 2 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.

Z

Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения



Д.Ю. Павлюков

0054162

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 03.02.2012 № 340-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И.Покровский
«01» августа 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической
лихорадки (ККГЛ, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV*) в
биологическом материале методом полимеразной цепной реакции
(ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] CCHFV-FL»

АмплиСенс[®]



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 3 |
| НАЗНАЧЕНИЕ..... | 3 |
| ПРИНЦИП МЕТОДА | 3 |
| ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ..... | 4 |
| АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ | 5 |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ | 6 |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ..... | 7 |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..... | 11 |
| ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК..... | 11 |
| ФОРМАТ FRT..... | 13 |
| СОСТАВ..... | 13 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ | 15 |
| ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ | 15 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИИ кДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»..... | 15 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации | 15 |
| Б. Проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с детекцией в режиме «реального времени»..... | 17 |
| АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ | 17 |
| СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ..... | 21 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1..... | 22 |
| Экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, клещей с применением комплекта реагентов «РИБО-преп»..... | 22 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 2..... | 24 |
| Экстракция РНК из клещей с применением комплекта реагентов «РИБО-золь-В» | 24 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ..... | 26 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

| | |
|--|---|
| ВКО | - внутренний контрольный образец |
| К– | - отрицательный контроль ПЦР |
| К+ | - положительный контроль ПЦР |
| кДНК | - комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК |
| НК | - нуклеиновые кислоты (РНК/ДНК) |
| ОК | - отрицательный контроль экстракции РНК |
| ОКО | - отрицательный контрольный образец |
| ПК | -положительный контроль экстракции РНК |
| ПКО | - положительный контрольный образец |
| ПЦР | - полимеразная цепная реакция |
| ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора | - федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека |
| <i>СCHFV</i> | - <i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus</i> , вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки |
| FRT | - флуоресцентная детекция в режиме «реального времени» |

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *СCHFV-FL*» предназначен для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (*СCHFV*) в клиническом материале (плазма и сыворотка крови) и клещах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *СCHFV* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя следующие этапы: экстракция РНК из образцов биологического материала, обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация участка кДНК *СCHFV* и гибридизационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT).

Экстракция РНК из биологического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-гес), который позволяет контролировать выполнение

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами проводится обратная транскрипция РНК с помощью фермента ТМ-ревертазы и амплификация участка кДНК *CSHFV* при помощи специфичных к этому участку кДНК праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствует флуоресцентно-меченый олигонуклеотидный зонд, который гибридизуется с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфических продуктов амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов. Детекция флуоресцентных сигналов при использовании формата FRT происходит непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-золь-В» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 4 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо дополнительно использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в зависимости от вида исследуемого материала.

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из биологического материала, обратную транскрипцию РНК и амплификацию кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 4 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Использование формы комплектации 4 производится только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

| Вид биологического материала (объем исследуемой пробы) | Комплект для выделения РНК/ДНК | Комплект для амплификации и детекции | Аналитическая чувствительность, копий/мл | Пробоподготовка материала |
|---|--------------------------------|--------------------------------------|--|--|
| Сыворотка крови (100 мкл) Клещи <i>H. marginatum</i> пулы (50 мкл) | «РИБО-преп» | «ПЦР-комплект» вариант FRT | 5×10^3 | Данная чувствительность достигается при соблюдении нижеизложенных правил пробоподготовки биоматериала и рекомендуемом объеме исследуемой пробы |
| Клещи <i>H. marginatum</i> пулы (100 мкл) | «РИБО-золь-В» | «ПЦР-комплект» вариант FRT | 5×10^3 | |

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность изучена на:

- флавивирусах (вирус Западного Нила, Омской геморрагической лихорадки);
- герпесвирусах (I и II типов, CMV, EBV, VZV, IV типа), энтеровирусах (ECHO, Coxsackie);
- риккетсиях группы пятнистых лихорадок (*Rickettsia conorii* ssp. *caspia*, *Coxiella burnetii*);
- ортобуньявирусах (вирус Тягини, Батаи);
- хантавирусах (Пумала, Добрава);

- тогатовирусах (Баткен).

При работе с РНК/ДНК вышеперечисленных организмов, ДНК человека и ДНК клещей ложноположительных результатов выявлено не было.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ВНИМАНИЕ! В соответствии с Директивой Европейского Союза 67/548/ЕЕС следующие реагенты подлежат маркировке, как содержащие опасные вещества, а также требуют указания факторов риска (R) и мер предосторожности (S):

| Наименование реагента | Наименование комплекта, в который входит реагент | Наименование опасного (в соответствии с директивой 67/548/ЕЕС) вещества | Код опасности, перечень факторов риска (R) и мер предосторожности (S) в соответствии с директивой 67/548/ЕЕС | по ГН 2.2.5.1313-03 ² | | | |
|--------------------------|--|---|--|----------------------------------|--------------------|-------------------------------------|---|
| | | | | ПДК макс разовая/среднесменная | основная опасность | класс опасности | автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны |
| Раствор для лизиса | «РИБО-преп» | Гуанидин тиоцианат | Harmful ³ R:20/21/22-32-52/53 S:13-61 | Нет данных | | | |
| Раствор D | «РИБО-золь-В» | Изопропанол | Highly flammable. Irritant ³ R:11-36-67 S:7-16-24/25-26 | 50/ 10 | Пар ы | Кла сс опа сно сти 3 | не тре буе тся |
| Раствор для преципитации | «РИБО-преп» | | | | | | |
| Раствор С | «РИБО-золь-В» | | | | | | |
| Раствор А | «РИБО-золь-В» | Фенол | Toxic, Corrosive ³ R: 23/24/25-34- 48/20/21/22-68 S: 24/25-26-28- 36/37/39-45 | 1/ 0,3 | Пар ы | Кла сс опа сно сти 2 | не тре буе тся |
| Раствор В | «РИБО-золь-В» | Хлороформ | Harmful ³ R: 22-38-40- 48/20/22 S: 36/37 | 10/ 5 | Пар ы | Кла сс опа сно сти 2 | не тре буе тся |
| Раствор для отмывки 3 | «РИБО-преп» «РИБО-золь-В» | Этанол | Highly flammable ³ R:11 S:7-16 | 2000, 1000 | Пар ы | Кла сс опа сно сти 4 | не тре буе тся |
| раствор для отмывки 4 | «РИБО-преп» | | | | | | |

Расшифровка обозначений факторов риска (R) и мер предосторожности (S).

R11: легко воспламеняется.

R20/21/22: опасен при проглатывании, контакте с кожей или вдыхании.

R22: опасен при проглатывании.

R23/24/25: ядовит при вдыхании, контакте с кожей и при проглатывании.

² Данные ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76. ССБТ. «Вредные вещества. Классификация. Общие требования безопасности».

³ Используются данные о коде опасности, факторах риска (R) и мерах предосторожности (S) фирмы Sigma-Aldrich (harmful - вредный для здоровья, highly flammable – легко воспламеняющийся, irritant - вызывающий раздражение, toxic- токсичный, corrosive- коррозионный).

R32: при контакте с кислотой образует токсичный газ.
R34: вызывает ожоги.
R36: раздражает слизистую глаз.
R38: раздражает кожу.
R40: ограниченное число доказательств канцерогенного эффекта.
R48/20/22: опасность серьезного вреда для организма при длительном вдыхании и приеме внутрь.
R48/20/21/22: опасность серьезных повреждений организма при длительном вдыхании, контакте с кожей или при приеме внутрь.
R52/53: опасен для водных организмов, может вызывать долговременное нежелательное воздействие на водную среду.
R67: пары вещества могут вызывать сонливость и головокружение.
R68: риск необратимых последствий.
S7: держать емкость плотно закрытой.
S13: держать вдали от пищевых продуктов и напитков, продуктов для животных.
S16: держать вдали от источников огня, не курить.
S24/25: избегать контакта с кожей и глазами.
S26: в случае попадания в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться за медицинской помощью.
S28: после попадания на кожу промыть большим количеством воды.
S36/37: использовать соответствующую защитную одежду и перчатки.
S36/37/39: использовать соответствующую защитную одежду, перчатки и маску/очки.
S45: в случае происшествия или ухудшения самочувствия немедленно обратиться за медицинской помощью.
S61: избегать попадания в окружающую среду.

ВНИМАНИЕ! При работе с легковоспламеняющимися веществами соблюдать правила пожарной безопасности для учреждений здравоохранения ППБО 07-91 от 30.08.91

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. 0,15 М NaCl или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия

- монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2).
2. Комплекты реагентов для выделения РНК/ДНК (в зависимости от типа исследуемого биоматериала) – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или «РИБО-золь-В» (ТУ 9398-073-01897593-2008), или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 1.
 3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК/ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК.
 4. Гомогенизатор TissueLyser LT (Qiagen, Германия) рекомендуется использовать для гомогенизации клещей.
 5. Металлические шарики из нержавеющей стали диаметром 7 мм.
 6. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
 7. Центрифуга/вортекс.
 8. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
 9. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл и до 200 мкл в штативах.
 10. Штативы для пробирок объемом 0,2 и 0,1 мл.
 11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
 12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК/РНК.
 13. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 14. Емкость для сброса наконечников.
 15. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), ДТ-96 (ДНК-технологии, Россия) или аналогичные).
 16. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axugen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с

плоской крышкой или 0,1 мл (например, Axugen, США) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

1. Плазма крови, сыворотка крови. Взятие цельной периферической крови проводится утром натощак в пробирку с 6 % раствором ЭДТА из расчета 1:20. Закрытую пробирку с цельной периферической кровью несколько раз переворачивают. Для отбора плазмы пробирку с кровью центрифугируют в течение 20 мин при 1600 г. Сыворотку крови получают стандартными методами. Для исследования отбирают 100 мкл клинического материала.
2. Клещи. Предварительно формируют пулы клещей: голодных объединяют по 5-7 особей, полупитавшихся – по 2-3; полностью питающихся – по 1. Для приготовления суспензий клещей используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. При наличии автоматического гомогенизатора TissueLyser LT применяют следующие параметры для гомогенизации клещей рода *Hyalomma* (диаметр шариков – 7 мм; частота – 50 Гц/с; время гомогенизации – 12-15 мин; объем буфера – 700 мкл (ненапитавшийся клещ), 1000-1500 мкл (напитавшийся клещ и пулы клещей). В случае гомогенизации питающихся клещей в ступке их предварительно прокалывают стерильной одноразовой иглой в нескольких местах для выхода крови. Клещей предварительно отмывают в 70 % этаноле в случае если клещ загрязнен маслом. Клещей растирают в 700 мкл (если проба состоит из одного ненапитавшегося клеща) или в 1-1,5 мл (если гомогенизируют пул клещей или питавшегося клеща) 0,15 М раствора хлорида натрия или PBS-буфера, смешивая

раствор с клещами небольшими объемами, затем полученную суспензию центрифугируют при 10 000 g в течение 1 мин и отбирают 50 мкл надосадочной жидкости для выделения РНК с набором «РИБО-преп». РНК из полностью напитавшихся клещей рекомендуется выделять с применением набора реагентов «РИБО-золь-В». В этом случае для выделения РНК отбирают 100 мкл осветленной клещевой суспензии.

Допускается хранение вышеперечисленного клинического материала до проведения исследования в течение суток при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед – при температуре не выше минус 16 °С. Клещей хранят или живыми (до 1 мес) или 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее - при температуре минус 70 °С.

**ФОРМАТ FRT
СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК участка генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|---------------------------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT CCHFV | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |
| ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,3 | 1 пробирка |
| RT-G-mix-2 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,015 | 1 пробирка |
| Полимераза (TaqF) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 1 пробирка |
| ТМ-Ревертаза (MMiv) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,015 | 1 пробирка |
| ПКО кДНК CCHFV / STI | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| РНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 2 пробирки |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» прилагаются следующие реагенты:

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|-------------------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,6 | 1 пробирка |
| ПКО CCHFV-FL-rec | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 5 пробирок |
| ВКО STI-87-rec | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,12 | 5 пробирок |
| тРНК 1 мкг/мкл | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,06 | 5 пробирок |

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 (ТУ 9398-071-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|--------------------------|---|------------------|---------------|
| Раствор для лизиса | Прозрачная жидкость голубого цвета ⁴ | 15 | 1 флакон |
| Раствор для преципитации | Прозрачная бесцветная жидкость | 20 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 3 | Прозрачная бесцветная жидкость | 25 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 4 | Прозрачная бесцветная жидкость | 10 | 1 флакон |
| РНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 4 пробирки |

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2.

Комплект реагентов «РИБО-золь-В» вариант 50 (ТУ 9398-073-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК из клинического материала – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|-----------------------|--------------------------------------|------------------|---------------|
| Раствор D | Прозрачная бесцветная жидкость | 20 | 1 флакон |
| Раствор E | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,5 | 1 пробирка |
| Раствор A | Прозрачная жидкость оранжевого цвета | 15 | 1 флакон |
| Раствор B | Прозрачная бесцветная жидкость | 5,0 | 1 пробирка |
| Раствор C | Прозрачная бесцветная жидкость | 20 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 3 | Прозрачная бесцветная жидкость | 50 | 1 флакон |
| РНК-элюент | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 5 пробирок |

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

⁴ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Проведение обратной транскрипции и ПЦР-амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® CCHFV-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции РНК CCHFV из различных биологических объектов рекомендуется использовать следующие комплекты реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора:

- **«РИБО-преп»** – экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, суспензии голодных и полунапитавшихся клещей;
- **«РИБО-золь-В»** – экстракция РНК из суспензии полностью напитавшихся клещей.

При использовании формы комплектации 2 экстракция РНК проводится с помощью комплекта «РИБО-преп» в соответствии с Приложением 1. При использовании формы комплектации 3 экстракция РНК проводится с помощью комплекта «РИБО-золь-В» в соответствии с Приложением 2.

ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИИ КДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в

режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы РНК – 10 мкл.

1. Приготовить реакционную смесь на необходимое количество реакций - смешайте в отдельной пробирке **ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT CCHFV**, **ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT**, полимеразу (**TaqF**), **ТМ-Ревертазу (MMIv)** и **RT-G-mix-2**, из расчета на каждую реакцию:

- **10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT CCHFV**;
- **5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT**;
- **0,5 мкл полимеразы (TaqF)**;
- **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)**;
- **0,25 мкл RT-G-mix-2**.

При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается амплификацией как минимум четырех контрольных образцов: положительного контроля экстракции (ПК), отрицательного контроля экстракции (ОК), положительного и отрицательного контролей ОТ-ПЦР (К+ и К-).

2. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь не хранить.

3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Осторожно перемешать пипетированием.

4. Поставить контрольные реакции:

- а) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера**.
- б) **положительный контроль ОТ-ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК CCHFV / STI**.

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси и проб РНК и контролей.

Б. Проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы обратной транскрипции, амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 1)

Таблица 1

| Цикл | Приборы роторного типа ⁵ | | | Приборы планшетного типа ⁶ | | |
|------|-------------------------------------|--|---------------|---------------------------------------|--|---------------|
| | Температура, °С | Время | Кол-во циклов | Температура, °С | Время | Кол-во циклов |
| 1 | 50 | 30 мин | 1 | 50 | 30 мин | 1 |
| 2 | 95 | 15 мин | 1 | 95 | 15 мин | 1 |
| 3 | 95 | 10 с | 5 | 95 | 10 с | 5 |
| | 54 | 25 с | | 54 | 30 с | |
| | 72 | 15 с | | 72 | 15 с | |
| 4 | 95 | 10 с | 45 | 95 | 10 с | 45 |
| | 50 | 25 с детекция флуоресц. сигнала | | 50 | 35 с детекция флуоресц. сигнала | |
| | | 72 | | | 15 с | |

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM/Green и JOE/Yellow/HEX.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. **Лунка №1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой.**
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

⁵ Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) или аналогичные.

⁶ Например, iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), ДТ-96 (ДНК-технологии, РФ) или аналогичные.

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК ВКО STI-87-rec;
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК *СCHFV*.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- кДНК *СCHFV* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение. При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- кДНК *СCHFV* **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение, а по каналу JOE значение порогового цикла не определено или превышает указанное граничное значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора JOE, и по каналу для флуорофора FAM значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической

лихорадки (ККГЛ, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® CCHFV-FL».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и положительного и отрицательного контролей экстракции РНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 2).

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Значение порогового цикла, C_t | |
|----------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | | по каналу для флуорофора JOE | по каналу для флуорофора FAM |
| OK | Экстракция РНК | Значение отсутствует | Определено значение меньше граничного |
| ПК | Экстракция РНК | Определено значение меньше граничного | Определено значение меньше граничного |
| К– | ПЦР | Значение отсутствует | Значение отсутствует |
| К+ | ПЦР | Определено значение меньше граничного | Определено значение меньше граничного |

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК.
2. Если для положительного контроля экстракции РНК (ПК) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить экстракцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК.
3. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (OK) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, детектируемая на канале для флуорофора JOE.

4. Если для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и JOE определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, детектируемая на канале для флуорофора JOE, с постановкой К– не менее чем в трех повторах.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разупаковать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-преп», «РИБО-золь-В» и «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. РНК-элюент (из комплекта «РИБО-золь-В»), RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *СCHFV*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv) и тРНК 1 мкг/мкл (из комплекта «ПЦР-комплект») хранить при температуре не выше минус 16 °С. ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *СCHFV* хранить в защищенном от света месте.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *СCHFV-FL*» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23 e-mail: products@pcr.ru)⁷.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н.Родионова

Директор ФГУЗ Ставропольский
научно-исследовательский противочумный
институт Роспотребнадзора



А.Н.Куличенко

⁷ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, клещей с применением комплекта реагентов «РИБО-преп»

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку, предназначенную для экстракции исследуемых проб, по **10 мкл ВКО STI-87-rec** и по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-87-rec** внести по **50 мкл** суспензий клещей либо по **100 мкл** плазмы, сыворотки.
4. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **10 мкл ВКО STI-87-rec** и **300 мкл раствора для лизиса**, затем добавить **10 мкл ПКО CCHFV-FL-rec**.
5. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **только 10 мкл ВКО STI-87-rec** и **300 мкл раствора для лизиса**.
6. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
7. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 10 000 g**.
8. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
10. Центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.

11. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
13. Процентрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
15. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
16. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
17. Процентрифугировать пробирки при **10 000 g** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Экстракция РНК из клещей с применением комплекта реагентов «РИБО-золь-В»

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку, предназначенную для экстракции исследуемых проб, по **10 мкл ВКО STI-87-гес**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора D**. Промаркировать пробирки.
2. В пробирки с **раствором D** и **ВКО STI-87-гес** внести по **100 мкл** суспензий клещей.
3. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **10 мкл ВКО STI-87-гес** и **300 мкл раствора D**, затем **80 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО CCHFV-FL-гес**.
4. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **10 мкл ВКО STI-87-гес** и **300 мкл раствора D**, затем **90 мкл ОКО**.
5. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 56 °С** в термостате. Процентрифугировать на вортексе для удаления капель с крышки пробирки.
6. Добавить к раствору **30 мкл раствора E**. Перемешать на вортексе процентрифугировать для удаления капель с крышки пробирки.
7. Добавить к раствору **300 мкл раствора A**, перемешать на вортексе и процентрифугировать для удаления капель с крышки пробирки.
8. Добавить к раствору **100 мкл раствора B**. Перемешивать на вортексе 1-2 мин (раствор должен стать молочно-белым).
9. Поставить пробирки в холодильник (температура от 2 до 4 °С) на 10 мин.
10. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. В процессе центрифугирования раствор разделится на две фазы: нижнюю, содержащую белки и ДНК, и верхнюю – водную, содержащую РНК.
11. Отобрать новые пробирки на 1,5 мл, в которые необходимо внести **300 мкл раствора C**. Промаркировать пробирки. В пробирки с отрицательным и положительным контролем

экстракции (промаркированы **ОК** и **ПК**) внести по **10 мкл РНК 1 мкг/мкл**.

12. Аккуратно отобрать верхнюю фазу (приблизительно 400 мкл), используя наконечники с фильтром и перенести в пробирку с раствором С. Перемешать на вортексе и выдержать в морозильнике при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 ч.
13. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. Удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником на 1 мл, не задевая осадка.
14. Растворить осадок в **100 мкл раствора D**, добавить **100 мкл раствора С**, перемешать на вортексе. Выдержать в морозильнике при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 ч.
15. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. Удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником на 1 мл, не задевая осадка.
16. Осадок промыть в **800 мкл охлажденного при температуре плюс 2 до 8 °С раствора для отмывки 3**, перемешивая на вортексе. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. Удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником на 1 мл, не задевая осадка.
17. Добавить **150 мкл охлажденного раствора для отмывки 3**. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. Удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником на 200 мкл, не задевая осадка.
18. Поместить пробирки в термостат при температуре 56 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
19. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-элюента**. Растворить осадок РНК в пробирке, перемешивая элюат на вортексе. В случае высокой вязкости раствора увеличить объем элюента до 100 мкл. Прогреть пробирки в термостате в течение 5-7 мин.
20. Центрифугировать пробирки 2 мин при 10 тыс g. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР. **Раствор РНК хранить при температуре не выше минус 68 °С.**

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации



Код партии



Максимальное
число тестов



Изделие для in vitro
диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Ограничение
температуры



Не допускать
попадания
солнечного света



Верхнее ограничение
температуры



Дата
изготовления



Производитель



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 13 марта 2019 года № ФСР 2012/12997

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСене® CCHFV-FL" по ТУ 9398-188-01897593-2011

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Производитель

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Место производства медицинского изделия

см. приложение

Номер регистрационного досье № РД-26132/11177 от 01.03.2019

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 3

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности 21.20.23.110

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 13 марта 2019 года № 1970
допущено к обращению на территории Российской Федерации

**Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения**

Д.Ю. Павлюков

0042605



**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 13 марта 2019 года № ФСР 2012/12997

Лист 1

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, ССНФV) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® ССНФV-FL" по ТУ 9398-188-01897593-2011:

Формат FRT.

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-золь-В» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 4 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.

Handwritten mark

**Заместитель руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения**



**Д.Ю. Павлюков
0054580**