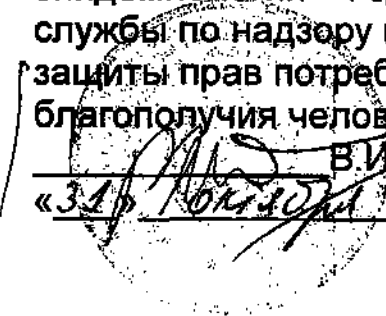


Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

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
«31» _____ 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Onchocerca volvulus*
в клиническом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *Onchocerca volvulus*-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	4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ...	7
ФОРМАТ FRT	8
СОСТАВ	8
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	8
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	9
А. Подготовка пробирок для амплификации	9
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	10
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	10
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	13
ПРИЛОЖЕНИЕ	14
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	16

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- Внутренний контрольный образец
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
FRT	- Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Onchocerca volvulus*-FL» предназначен для выявления ДНК *Onchocerca volvulus* в клиническом материале (срезы кожи) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК *Onchocerca volvulus* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя два этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала и амплификацию участка ДНК данного микроорганизма с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция ДНК из клинического 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 участка ДНК *Onchocerca volvulus* при помощи специфичных к этому участку ДНК 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. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью

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

амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

В наборе реагентов применяется «горячий старт», что значительно снижает количество неспецифических реакций. «Горячий старт» обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы. Химически модифицированная полимераз (TaqF) активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °C в течение 15 мин.

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-50 F.

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации ДНК *Onchocerca volvulus* 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 клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ²
Срезы кожи	«ДНК-сорб-С»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1x10 ³

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на следующих штаммах микроорганизмов: *Streptococcus* группы A, B, G, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis*,

² Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала, помещенного в транспортную среду

Epidemophyton floccosum, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Bacillus anthracis*, а также ДНК *Ascaris suis*, *Dirofilaria immitis*, ДНК человека.

При проведении тестирования данной панели 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-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

1. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-С» (ТУ 9398-075-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.
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, от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 и 200 мкл в штативах (например, Ахугел, 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 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), CFX96 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) 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 или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (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.

Материалом для исследования служат: срезы кожи человека. Делают несколько срезов кожи в области гребешков подвздошной кости, дельтовидной, икроножной мышцы и области лодыжки, боковых поверхностей грудной клетки, главным образом, с тех участков тела, на которых заметны изменения кожи и отмечается зуд.

Способ получения срезов кожи: кусочек кожи размером 2 x 4 мм срезается лезвием бритвы или острым скальпелем с участка, поднятого кончиком иглы или пинцетом. Микробиоптат помещают в стерильную одноразовую пробирку типа «Эппендорф», содержащую 100 мкл физиологического раствора.

Допускается хранение материала до проведения ПЦР-исследования при комнатной температуре в течение 6 ч.

ФОРМАТ FRT

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

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

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>Onchocerca volvulus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирки
ПКО ДНК <i>Onchocerca volvulus</i> и STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-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
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	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 набора реагентов для выявления ДНК *Onchocerca volvulus* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Onchocerca volvulus* -FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «ДНК-сорб С» в соответствии с приложением или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). В качестве отрицательного контроля экстракции (В-) используют ОКО.

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.

1. Разморозить реагенты набора, хранящиеся при температуре не выше минус 16 °С. Все реагенты набора тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок кратким центрифугированием.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для проведения N реакций (включая 2 контроля ПЦР) смешать в отдельной пробирке 10х(N+1) мкл ПЦР-смеси-1-FL *Onchocerca volvulus*, 5,0х(N+1) мкл ПЦР-смесь-2-FRT и 0,5х(N+1) мкл полимеразы (TaqF).
4. Перемешать подготовленную смесь 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 ДНК-буфера.
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО *Onchocerca volvulus* и STI.

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

Цикл	Приборы роторного типа ³			Приборы планшетного типа ⁴		
	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	10 с	5	95	10 с	5
	60	20 с		60	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
3	95	10 с	40	95	10 с	40
	55	20 с детекция флуоресц. сигнала		55	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с		72	25 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по двум каналам для флуорофоров FAM и JOE (при одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам)⁵.

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 кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВКО-FL,

³ например, Rotor-Gene 3000, 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.

⁴ например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), CFX96 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁵ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов

ФОРМАТ FRT

- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК *Onchocerca volvulus*.

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 *Onchocerca volvulus* **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 данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК *Onchocerca volvulus* **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее 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.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора для выявления ДНК *Onchocerca volvulus* в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Onchocerca volvulus*-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 табл. 2.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t	
		по каналу для флуорофора FAM	по каналу для флуорофора JOE
В–	Экстракция ДНК	Определено значение меньше граничного	Значение отсутствует
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 C_t по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Onchocerca volvulus*.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Onchocerca volvulus*, начиная с этапа экстракции ДНК.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

ПРИЛОЖЕНИЕ

Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-С».

Порядок работы.

1. Буфер для лизирующего реагента и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60-64 °С до полного растворения кристаллов.
2. В каждую пробирку с биоптатом, помещенным в физиологический раствор, отдельными наконечниками с фильтром внести по 400 мкл буфера для лизирующего реагента и по 17 мкл лизирующего реагента. В пробирку отрицательного контроля (В-) экстракции внести 100 мкл ОКО. Тщательно перемешать содержимое пробирок.
3. Инкубировать пробирки при температуре 60 °С в течение 1 ч, периодически встряхивая на вортексе (5 раз через каждые 10–12 мин). Допускается инкубация в течение 12 ч при температуре 60 °С.
4. Осадить нерастворенные частицы образцов центрифугированием при (12-14) тыс об/мин в течение 5 мин.
5. Надосадочную жидкость в объеме 200-350 мкл очень аккуратно (так, чтобы не попали взвешенные частицы и капли жира) отобрать отдельными наконечниками с фильтром и перенести в новые пробирки.
6. Отдельными наконечниками с фильтром внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО-FL. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе.
7. Пробы прогреть 5 мин при температуре 60 °С. Еще раз перемешать и процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для сброса капель с крышки пробирки
8. Тщательно ресуспендировать сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, оставить в штативе на 10-15 мин, перемешивая через каждые 2 мин.
9. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 1 мин. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
10. Добавить в пробы по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

течение 1 мин. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

11. Добавить в пробы по 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 1 мин при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
12. Повторить процедуру отмывки, следуя пункту 11, отобрать надосадочную жидкость полностью.
13. Поместить пробирки в термостат при температуре 64-65 °C на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
14. В пробирки добавить по 50-100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК (в зависимости от размера образца 10-25 мм³). Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 64-65 °C на 5-10 мин, периодически (1 раз в мин) встряхивая на вортексе.
15. Процентрифугировать пробирки при (12-14) тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке 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



Производитель



Дата изготовления

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.

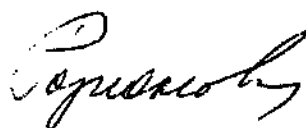
Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *Onchocerca volvulus*, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *Onchocerca volvulus* хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Onchocerca volvulus* - 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
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

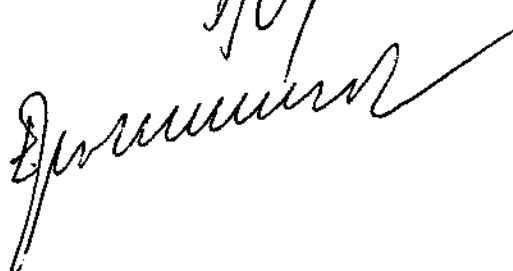


Е.Н. Родионова

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



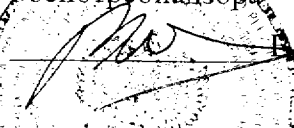
Е.Л. Никонов



⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 16 лист.

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора


В. В. Малеев