



Инструкция по применению набора реagens расположена на сайте www.pcr.ru или www.amplisens.ru

Форма 1: **REF** H-2171-1-1;
Форма 2: **REF** H-2172-1-14



Краткое руководство

набор реagens для диагностики *in vitro* **АмплиСенс® *Streptococcus* *pyogenes*-скрин/монитор-FL**

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN
Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L



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



VER 01.07.19

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реagens в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реagens. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реagens.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Рекомендуемые комплекты:

- «РИБО-преп» и другие, рекомендованные Изготовителем;

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-FL) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции		
При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:		
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
ОКО + ПКО <i>Streptococcus pyogenes</i>	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для ПК (положительного контроля экстракции)
Элюция		
Все образцы	50 мкл	в каждую пробирку

ПОДГОТОВКА ПРОБИРОК ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплект» вариант FRT-100FN

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 ДНК-калибратор K1, 1 ДНК-калибратор K2, 1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL *Streptococcus pyogenes* и ПЦР-буфером-Н.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смеси-FL <i>Streptococcus pyogenes</i>	10*(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-Н	5*(N+K+1)	

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб:

Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	в пробирку для ОК
Пробы ДНК, экстрагированной из ПК	в пробирку для ПК
K1 SP	в 2 пробирки для ДНК-калибратора K1
K2 SP	в 2 пробирки для ДНК-калибратора K2

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (K-). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл K-.

ПОДГОТОВКА ПРОБИРОК ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (25 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 ДНК-калибратор K1, 1 ДНК-калибратор K2, 1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

- Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью *Streptococcus pyogenes-Lyo* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 25 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	в пробирку для ОК
Пробы ДНК, экстрагированной из ПК	в пробирку для ПК
K1 SP	в 2 пробирки для ДНК-калибратора K1
K2 SP	в 2 пробирки для ДНК-калибратора K2

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (K-). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл K-.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени».

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

Цикл	Единая программа амплификации «АмплиСенс»			
	Температура, °С	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE	

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных 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:

Флуорофор	FAM	JOE
Мишень для амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i>

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct).

На основании полученных значений порогового цикла (Ct) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений ГЭ ДНК *Streptococcus pyogenes* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны значения концентраций калибраторов, диапазон концентраций ПКО *Streptococcus pyogenes* и граничные значения Ct, необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.