



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 °C – 15 минут) для экономии времени.

| Цикл | Единая программа амплификации «АмплиСенс» | | | |
|------|---|--------|---|---------------|
| | Температура, °C | 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 (C_t).

На основании полученных значений порогового цикла (C_t) 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 C_t, необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.