



Инструкция по применению набора реagens расположена на сайте [www.pcr.ru](http://www.pcr.ru) или [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru)



## Краткое руководство

### набор реagens для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Rickettsia conorii*-FL

Форма 1: «ПЦР-комплект»  
вариант FRT-50 FN



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



REF H-2741-1 / VER 12.04.17

#### **ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

##### **Рекомендуемые комплекты:**

- РИБО-преп» для экстракции ДНК из крови, ликвора, клещей, тканевого (аутопсийного и биопсийного) материала и смывов с первичного аффекта;
- «МАГНО-сорб» для экстракции ДНК из клещей.

**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 на дно
кровь и ликвор	осадок и 100 мкл надосадочной жидкости	в пробирки для исследуемых образцов
тканевой (биопсийный и аутопсийный) материал; суспензия иксодовых клещей	100 мкл	
В пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции) реагент ОКО <b>не вносить!</b>		
элюция	50 мкл	в каждую пробирку

При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» <sup>1</sup> добавить:		
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку на дно
суспензия иксодовых клещей	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
элюция	100 мкл	в каждую пробирку

### АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

**Контроли:** для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный (K+) и 1 отрицательный (K-) контроли ПЦР; 1 отрицательный (ОК) контроль экстракции.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
2. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL *Rickettsia conorii*.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

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

4. Отобрать необходимое количество пробирок для ПЦР 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, <b>ОК</b> <i>При экстракции с помощью сорбционных методов избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	
K+ <i>Rickettsia conorii</i>	в пробирку для K+
K-	в пробирку для K-

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

**ВНИМАНИЕ!** Провести ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и ДНК-пробы и контролей.

5. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы для приборов роторного типа<sup>2</sup> и планшетного типа<sup>3</sup>.

**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 *Rickettsia conorii*, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени, но увеличить продолжительность шага при температуре 60 °C до 30 с в третьем цикле.

Программа амплификации <sup>4</sup>					Единая программа амплификации «АмплиСенс»				
Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов	Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1	1	50	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45	3	95	15 мин	–	45
	60	30 с	<b>FAM, JOE</b>			95	10 с	–	
						60	20 с	<b>FAM, JOE</b>	

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

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

**ВНИМАНИЕ!** При неполной загрузке приборов планшетного типа установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

7. 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>Rickettsia conorii</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 РНК значения порогового цикла (Ct).

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

<sup>1</sup> См. Приложение 1 Инструкции по применению набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Rickettsia conorii*-FL.

<sup>2</sup> Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

<sup>3</sup> Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

<sup>4</sup> Используйте программу амплификации, если нет необходимости использовать единую программу амплификации «АмплиСенс».