



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



Краткое руководство

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

Форма 2: «ПЦР-комплект»
вариант FRT-L



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



REF Н-2742-1-4 / 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 не вносить!		
элюция	100 мкл	в каждую пробирку

При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» ¹ 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 (25 мкл).

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью *Rickettsia conorii*-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

Внести по 25 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК При экстракции с помощью сорбционных методов избежать попадания сорбента в реакционную смесь!
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	
К+ <i>Rickettsia conorii</i>	в пробирку для К+
К-	в пробирку для К-

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. Время внесения проб в реакционную смесь и запуск реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

2. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы для приборов роторного типа² и планшетного типа³.

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

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

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

3. 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.

4. 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.

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

² Например, Rotor-Gene Q (QiAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

³ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

⁴ Используйте программу амплификации, если нет необходимости использовать единую программу амплификации «АмплиСенс».