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

AmpliSens®

Краткое руководство

набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL

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

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

IVD

REF H-2791-1 / VER 03.03.17

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Рекомендуемые комплекты:
- «РИБО-преп» для экстракции ДНК из крови, ликвора, клещей, тканевого (аутопсийного и биопсийного) материала;
- «МАГНО-сорб» для экстракции ДНК из клещей.

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-FL) – в каждом образце.
Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный (ОК) контроль 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	50 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 (10 мкл).
Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К–)

[1] См. Приложение 1 Инструкции по применению набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL.

контроли ОТ-ПЦР; 1 отрицательный (ОК) контроль экстракции.

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

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL *Borrelia miyamotoi*	**10***(N+K+1)	**N** – количество исследуемых образцов; **K** – количество контролей; **1** – запас
ПЦР-буфер-Н	**5***(N+K+1)	

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, **ОК** ***При экстракции с помощью сорбционных методов избегать попадания сорбента в реакционную смесь!***
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	
К+ *Borrelia miyamotoi*	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.

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

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 цикле.

Цикл	Программа амплификации[4]				Цикл	Единая программа амплификации «АмплиСенс»			
	Темпера-тура, °С	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов		Темпера-тура, °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, ROX**		3	95	10 с	–	45
						60	20 с	**FAM, ROX**	

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:

[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».

Флуорофор	FAM	ROX
Мишень для амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК *Borrelia miyamotoi*

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*).

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