



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

Краткое руководство

набор реагентов АмплиСенс® *Rickettsia* spp. SFG-FL

Форма 1: **REF** Н-3741-1

Форма 2: **REF** Н-3742-1-4



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



VER 01.04.20

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

- «РИБО-преп» для экстракции ДНК из лейкоцитов крови, ликвора, клещей, тканевого материала и смывов с первичного аффекта;
- «МАГНО-сорб» для экстракции ДНК из клещей;
- другие комплекты, рекомендованные Изготовителем.

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО STI-87) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:

| | | |
|---|--|-------------------------------------|
| ВКО STI-87 | 10 мкл | в каждую пробирку |
| Кровь и ликвор | осадок и 100 мкл надосадочной жидкости | в пробирки для исследуемых образцов |
| Тканевой материал; суспензия иксодовых клещей | 100 мкл | |
| ОКО | 100 мкл | в пробирку для ОК |
| Элюция | | |
| все образцы | 50 мкл | в каждую пробирку (для формы 1) |
| | 100 мкл | в каждую пробирку (для формы 2) |

| Объем исследуемого образца, контролей и элюции | | |
|--|---------|-------------------------------------|
| При экстракции с помощью «МАГНО-сорб»¹ добавить: | | |
| ВКО STI-87 | 10 мкл | в каждую пробирку |
| Суспензия иксодовых клещей | 100 мкл | в пробирки для исследуемых образцов |
| ОКО | 100 мкл | в пробирку для ОК |
| Элюция | | |
| все образцы | 100 мкл | в каждую пробирку |

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 FN

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

Контроли: 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ПЦР, 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- Разморозить пробирки с ПЦР-смесью-FL *Rickettsia* spp. SFG и ПЦР-буфером-Н.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

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

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации 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 <i>При проведении экстракции методом магнитной сепарации необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i> |
| Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО | |
| К+ <i>Rickettsia</i> spp. SFG | 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.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L

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

Контроли: 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ПЦР, 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

- Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью *Rickettsia* spp. SFG-Lyo для амплификации исследуемых и контрольных образцов.

| Внести по 25 мкл | |
|--|--|
| Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов | в пробирки для исследуемых образцов, ОК <i>При проведении экстракции методом магнитной сепарации необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i> |
| Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО | |
| К+ <i>Rickettsia</i> spp. SFG | 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.

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. 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* spp. SFG, 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.

| Цикл | Программа амплификации ² | | | | Цикл | Единая программа амплификации «АмплиСенс» | | | |
|------|-------------------------------------|--------|---|---------------|------|---|-----------------|---|---------------|
| | Температура, °C | Время | Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров | Кол-во циклов | | 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 | 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.

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. 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

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме, с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

| Канал для флуорофора | FAM | JOE |
|--|----------------|--------------------------------|
| Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации | ДНК ВКО STI-87 | ДНК <i>Rickettsia</i> spp. SFG |

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны граничные значения порогового цикла (C_t), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

² Предпочтительнее использовать программу амплификации, если нет необходимости использовать единую программу амплификации «АмплиСенс».