



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

Краткое руководство

набор реагентов АмплиСенс® *Plasmodium* spp. / *P.falciparum* / *P.vivax*-FL

Форма 1: **REF** Н-3981-1

Форма 2: **REF** Н-3982-1-4



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



VER 14.08.20

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 цельной крови и комаров;
- «МАГНО-сорб» для экстракции ДНК из цельной крови.

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-FL) – 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-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Цельная кровь	50 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
Суспензия комаров	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)

При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» добавить:

ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Цельная кровь	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: для каждой группы амплифицируемых образцов 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 *Plasmodium* spp. и ПЦР-буфером-Н.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL <i>Plasmodium</i> spp.	$10*(N+K+1)$	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>Plasmodium</i> spp.	в пробирку для К+
К-	в пробирку для К-

ВНИМАНИЕ! Провести ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и ДНК-пробы / 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: для каждой группы амплифицируемых образцов 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 *Plasmodium* spp.-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>Plasmodium</i> spp.	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 / контролей.

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, 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 возбудителей, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

Цикл	Единая программа амплификации «АмплиСенс»			
	Температура, °С	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	

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! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>Plasmodium</i> spp.	ДНК <i>P.falciparum</i>	ДНК <i>P.vivax</i>	ДНК ВКО-FL

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