



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



## Краткое руководство

**набор реагентов для определения ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Аэробы-FL»**

**Форма 1** включает «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F



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



**REF** R-B88-100-FT; **REF** H-2351-1-1 / **VER** 22.04.19

### ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

#### Рекомендуемые комплекты:

- «ДНК-сорб-АМ» и другие рекомендованные Изготовителем.

**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 «ДНК-сорб-АМ» добавить:		
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
Элюция		
Все образцы	100 мкл	в каждую пробирку

**ВНИМАНИЕ!** При проведении количественного ПЦР-исследования недопустимо использование комплекта реагентов «ЭДЭМ» и других экспресс-методов экстракции ДНК.

### 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: 2 ДНК-калибратора (K1 и K2), 1 отрицательный (K-) контроль ПЦР; 1 отрицательный (ОК) контроль экстракции.

1. Перемешать содержимое пробирок с реагентами **ПЦР-смеси-FL ФлороЦеноз / Аэробы, ПЦР-буфера-В, полимеразы (TaqF)** и осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью вортекса.
2. Подготовить смесь **ПЦР-буфера-В** и **полимеразы (TaqF)**. Для этого содержимое одной пробирки с **полимеразой (TaqF) (60 мкл)** необходимо полностью перенести в пробирку с **ПЦР-буфером-В (600 мкл)** и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

**ВНИМАНИЕ!** Приготовленная смесь рассчитана на исследование **110** образцов. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL ФлороЦеноз / Аэробы	10*(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
Смесь ПЦР-буфера-В и полимеразы (TaqF)	5*(N+K+1)	

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

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов 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>OK</b> <i>При экстракции с помощью сорбционных методов избежать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	
K1 АВ	в пробирку для ДНК-калибратора <b>K1</b>
K2 АВ	в пробирку для ДНК-калибратора <b>K2</b>
K–	в пробирку для <b>K–</b>

5. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы для приборов роторного типа<sup>1</sup> и планшетного типа<sup>2</sup>:

**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 помимо указанных. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Единая программа амплификации «АмплиСенс» <sup>3</sup>				
Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	<b>FAM, JOE, ROX, Cy5</b>	

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1»								
Цикл	Приборы роторного типа				Приборы планшетного типа			
	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	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5	95	5 с	–	5
	60	20 с	–		60	20 с	–	
	72	15 с	–		72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40	95	5 с	–	40
	60	20 с	<b>FAM, JOE, ROX, Cy5</b>		60	30 с	<b>FAM, JOE, ROX, Cy5</b>	
	72	15 с	–		72	15 с	–	

**Примечание** – Канал для флуорофора **Cy5.5** включается при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используется этот канал.

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!** В случае неполной загрузки приборов планшетного типа необходимо дополнительно установить

<sup>1</sup> Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

<sup>2</sup> Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

<sup>3</sup> Программы амплификации «АмплиСенс» и «АмплиСенс-1» равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

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 4 каналам:

Флуорофор	FAM	JOE	ROX	Cy5
Мишень для амплификации	ДНК <i>Enterobacteriaceae</i>	ДНК <i>Staphylococcus spp.</i>	ДНК <i>Streptococcus spp.</i>	ДНК ВКО-FL

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).

На основании полученных значений порогового цикла (Ct) и заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 АВ и K2 АВ автоматически происходит построение калибровочной прямой и расчет числа копий ДНК-мишеней энтеробактерий, стафилококков или стрептококков для исследуемых и контрольных образцов.

Полученные значения используются для расчета количества геномных эквивалентов ДНК соответствующих микроорганизмов, содержащихся в 1 мл исходного образца биологического материала.

**ВНИМАНИЕ!** К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны:

- значения концентраций ДНК-калибраторов для построения калибровочной прямой,
- граничные значения концентраций и пороговых циклов, необходимые для анализа, интерпретации и оценки достоверности результатов,
- коэффициент К для расчета содержания ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков в биологическом материале в ГЭ/мл.