



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

Краткое руководство

набор реагентов АмплиСенс® MDR A.b.-OXA-FL

Форма 1: **REF** HN-3871-1

Форма 2: **REF** HN-3872-1-4



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



VER 02.04.20

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

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО) – в каждом образце¹.

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

Бактериальные культуры, полученные на плотной питательной среде

Образец/реагент	Объем	Действие
ГК-экспресс	250 мкл	добавить в каждую пробирку
Бактериальные клетки	10 ⁷ – 10 ⁹ клеток	добавить в пробирки для исследуемых образцов
Суспензия бактериальных клеток	20 мкл	

В пробирку для **ОК** (отрицательного контроля экстракции) ничего, кроме реагента ГК-экспресс, не добавлять!

Бактериальные культуры, полученные на жидкой питательной среде

Образец/реагент	Объем	Действие
ГК-экспресс	250 мкл	добавить в каждую пробирку с осадком бактериальных клеток
Жидкая питательная среда + ГК-экспресс	20 мкл + 250 мкл	добавить в пробирку для ОК

Все пробирки с исследуемыми и контрольными образцами:



- закрыть крышки, перемешать на вортексе, осадить капли;
- прогреть **10 мин** при **70 °С**, перемешать на вортексе;
- центрифугировать **1 мин** при **12 тыс g**

Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК

ВНИМАНИЕ! При повторном ПЦР-исследовании проб ДНК содержимое пробирок перемешать на вортексе и повторить центрифугирование.

¹ ВКО входит в состав реагента ГК-экспресс.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 F

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.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL Ab-OXA	$10 \cdot (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-В	$5 \cdot (N+K+1)$	
Полимераза (TaqF)	$0,5 \cdot (N+K+1)$	

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 пробирку для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной как образец ОК	в пробирку для ОК
ПКО-1 Ab-OXA	в пробирку для К+
К-	в пробирку для К-

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 Ab-OXA-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

Внести по 25 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирку для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной как образец ОК	в пробирку для ОК
ПКО-1 Ab-OXA	в пробирку для К+
К-	в пробирку для К-

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Цикл	Программа «АмплиСенс-В»							
	Приборы роторного типа				Приборы планшетного типа			
	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	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	35	95	5 с	–	35
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5		60	30 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	
	72	15 с	–		72	15 с	–	

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 вортксе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам:

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>A.baumannii</i>	гены карбапенемаз группы OXA-23- подобных	гены карбапенемаз группы OXA-58- подобных	гены карбапенемаз группы OXA-40- подобных	ДНК ВКО

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