

2.2 Промаркировать пробирки с ЛРС: KPA, ESE, LC, SES. Для каждого мультиплекса: N образцов + 1 ПКО + 1 ОКО.

«НК-Экстра», «РИБО-преп»			
На 1 реакцию	Исследуемый образец ДНК		22 мкл
	Контроли	ПКО	22 мкл
		ОКО	22 мкл

«ДНК-Фаст»			
На 1 реакцию	ОКО (во все пробирки)	7 мкл	
	ВКО (во все пробирки)	5 мкл	
	Исследуемый образец ДНК	10 мкл	
	Контроли	ПКО	10 мкл
		ОКО	10 мкл

2.4 Заклеить планшет (пробирки) пленкой, входящей в состав набора.

2.5 Центрифугировать пробирки 15 секунд.

2.6 Выдержать пробирки 3-5 минут для восстановления реакционной смеси при комнатной температуре.

3 ПЦР

Внимание! В случае использования амплификатора ДТ-96 необходимо произвести настройку экспозиции измерений: FAM - 500, HEX - 1000, ROX - 1000, Cy5 - 1000

Для амплификатора QuantStudio 5 перед запуском протокола нужно настроить оптические фильтры, чтобы избежать ложноположительных результатов из-за сигнала VIC в канале ROX (ΔRn > 100 000). В разделе «Method» нажать «Action», выбрать «Optical filter settings» и оставить фильтры: x1-m1, x2-m2, x4-m4, x5-m5, x6-m6

3.1. Амплификация по протоколу:

Стадия	Температура, °C	Время, мин.: сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	02:00	-	1
2	95	00:15	-	5
	64	00:20	-	
3	95	00:15	-	40
	64	00:20	FAM, HEX, ROX, Cy5	

4 Интерпретация результатов

4.1 Пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала детекции на уровне, соответствующем около 5–10 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для ПКО.

4.2 Результаты всей постановочной серии считают достоверными при получении следующих значений для контрольных образцов:

Внесенный материал	Канал, соответствующий флуорофору			
	FAM	HEX	ROX	Cy5
ОКО	Ct > 32 или отс.	Ct ≤ 32	Ct > 32 или отс.	Ct > 32 или отс.
ПКО	Ct ≤ 28	Ct ≤ 28	Ct ≤ 28	Ct ≤ 28

4.3 Интерпретация результатов в образцах ДНК для мультиплекса KPA:

Значения Ct		Результат
FAM, ROX, Cy5	HEX (ВКО)	
Интерпретация для нативного материала		
Ct ≤ 32	не учитывается	ДНК <i>Klebsiella pneumoniae</i> (FAM), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ROX), <i>Acinetobacter baumannii</i> (Cy5) обнаружены
Ct > 32 или отс.	Ct ≤ 32	ДНК <i>Klebsiella pneumoniae</i> (FAM), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ROX), <i>Acinetobacter baumannii</i> (Cy5) не обнаружены или ниже предела обнаружения
Ct > 32 или отс.	Ct > 32 или отс.	Для ДНК <i>Klebsiella pneumoniae</i> (FAM), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ROX), <i>Acinetobacter baumannii</i> (Cy5) результат невалидный
Интерпретация для бактериальных культур и гемокультур		
Ct ≤ 28	не учитывается	ДНК обнаружены
Ct > 28 или отс.	Ct ≤ 32	ДНК не обнаружены или ниже предела обнаружения
Ct > 28 или отс.	Ct > 32 или отс.	Для ДНК результат невалидный

4.4 Интерпретация результатов в образцах ДНК для мультиплекса ESE:

Значения Ct		Результат
FAM, ROX, Cy5	HEX(ВКО)	
Интерпретация для нативного материала		
Ct ≤ 32	не учитывается	ДНК <i>Staphylococcus spp.</i> (ген <i>mecA</i>) (FAM), <i>Enterococcus faecalis</i> (ROX), <i>Enterococcus faecium</i> (Cy5) обнаружены
Ct > 32 или отс.	Ct ≤ 32	ДНК <i>Staphylococcus spp.</i> (ген <i>mecA</i>) (FAM), <i>Enterococcus faecalis</i> (ROX), <i>Enterococcus faecium</i> (Cy5) не обнаружены или ниже предела обнаружения
Ct > 32 или отс.	Ct > 32 или отс.	Для ДНК <i>Staphylococcus spp.</i> (ген <i>mecA</i>) (FAM), <i>Enterococcus faecalis</i> (ROX), <i>Enterococcus faecium</i> (Cy5) результат невалидный
Интерпретация для бактериальных культур и гемокультур		
Ct ≤ 28	не учитывается	ДНК обнаружены
Ct > 28 или отс.	Ct ≤ 32	ДНК не обнаружены или ниже предела обнаружения
Ct > 28 или отс.	Ct > 32 или отс.	Результат невалидный

4.5 Интерпретация результатов в образцах ДНК для мультиплекса LC:

Значения Ct		Результат
FAM, Cy5	HEX(ВКО)	
Интерпретация для нативного материала		
Ct ≤ 32	не учитывается	ДНК <i>Staphylococcus spp.</i> (ген <i>lukS</i>) (FAM), <i>Staphylococcus spp.</i> (ген <i>mecC</i>) (Cy5) обнаружены
Ct > 32 или отс.	Ct ≤ 32	ДНК <i>Staphylococcus spp.</i> (ген <i>lukS</i>) (FAM), <i>Staphylococcus spp.</i> (ген <i>mecC</i>) (Cy5) не обнаружены или ниже предела обнаружения
Ct > 32 или отс.	Ct > 32 или отс.	Для ДНК <i>Staphylococcus spp.</i> (ген <i>lukS</i>) (FAM), <i>Staphylococcus spp.</i> (ген <i>mecC</i>) (Cy5) резуль- тат невалидный
Интерпретация для бактериальных культур и гемокультур		
Ct ≤ 28	не учитывается	ДНК обнаружены

Значения Ct		Результат
FAM, Cy5	HEX (ВКО)	
Ct > 28 или отс.	Ct ≤ 32	ДНК не обнаружены или ниже предела обнаружения
Ct > 28 или отс.	Ct > 32 или отс.	Результат невалидный

4.6 Интерпретация результатов в образцах ДНК для мультиплекса SES:

Значения Ct		Результат
FAM, ROX, Cy5	HEX (ВКО)	
Интерпретация для нативного материала		
Ct ≤ 32	не учитывается	ДНК <i>Staphylococcus aureus</i> (FAM), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (ROX), <i>Escherichia coli</i> (Cy5) обнаружены
Ct > 32 или отс.	Ct ≤ 32	ДНК <i>Staphylococcus aureus</i> (FAM), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (ROX), <i>Escherichia coli</i> (Cy5) не обнаружены или ниже предела обнаружения
Ct > 32 или отс.	Ct > 32 или отс.	Для ДНК <i>Staphylococcus aureus</i> (FAM), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (ROX), <i>Escherichia coli</i> (Cy5) результат невалидный
Интерпретация для бактериальных культур и гемокультур		
Ct ≤ 28	не учитывается	ДНК обнаружены
Ct > 28 или отс.	Ct ≤ 32	ДНК не обнаружены или ниже предела обнаружения
Ct > 28 или отс.	Ct > 32 или отс.	Результат невалидный

Условия хранения:

от 2 °C до 25 °C — 12 месяцев

Заморозка не допускается!

Условия транспортирования:

от 2 °C до 25 °C — не более 5 суток