



173-6 2018-11-16

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для количественного определения РНК
вируса гепатита С (HCV) методом обратной транскрипции
и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный

для прибора Rotor-Gene Q (Qiagen)

Каталожный номер:
Q4-P603-24/9CIS

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

Не предназначено для применения на территории Российской Федерации

СОДЕРЖАНИЕ

1	НАЗНАЧЕНИЕ	4
2	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	4
2.1	Принцип действия	4
2.2	Количество тестов.....	6
2.3	Состав набора	6
2.4	Время проведения анализа.....	7
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	8
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	9
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	10
6.1	Взятие образцов периферической крови.....	10
6.2	Транспортирование и хранение исследуемого материала.....	10
6.3	Получение плазмы крови	11
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	11
7.1	Выделение РНК из плазмы крови	11
7.2	Проведение реакции обратной транскрипции	14
7.3	Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции	15
7.4	Создание и запуск файла.....	18
8	РЕГИСТРАЦИЯ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ.....	26
9	УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.....	29
10	УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	31
11	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	32
12	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	32
13	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ.....	33
	ПРИЛОЖЕНИЕ.....	34

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для количественного определения РНК вируса гепатита С (HCV) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ–ПЦР)

ОТ–ГЕПАТОГЕН–С количественный

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1** Набор реагентов для количественного определения РНК вируса гепатита С (HCV) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ–ПЦР) ОТ–ГЕПАТОГЕН–С количественный предназначен для количественного определения РНК вируса гепатита С (Hepatitis C virus) в образцах плазмы крови методом обратной транскрипции с последующей амплификацией синтезированных фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.
- 1.2** Набор реагентов ОТ–ГЕПАТОГЕН–С количественный может быть использован в клинико-диагностической практике для диагностики гепатита С и оценки эффективности противовирусной терапии.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип действия

Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Таq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной

смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

Исследование с помощью набора реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный состоит из следующих этапов: выделение РНК (пробоподготовка), реакция обратной транскрипции, ПЦР-амплификация кДНК HCV в режиме реального времени.

На стадии выделения РНК в реакционную смесь добавляют внутренний контрольный образец (РНК-ВК), предназначенный для оценки эффективности всех этапов исследования.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации искомой кДНК, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации внутреннего контрольного образца (РНК-ВК), входит флуоресцентный краситель Hex (таблица 1).

Таблица 1 - Каналы детекции продуктов амплификации

Fam/Green	Hex/Yellow
HCV	РНК-ВК

Для проведения количественной оценки РНК HCV, набор реагентов ОТ–ГЕПАТОГЕН–С количественный включает калибровочные образцы HCV–РНК в двух концентрациях: $1,0 \times 10^6$ копий/мл и $3,0 \times 10^3$ копий/мл.

Использование калибровочных образцов (HCV–РНК–СТ) позволяет построить калибровочную прямую, при помощи которой можно определить концентрацию РНК HCV в исследуемых образцах плазмы крови.

2.2 Набор, включающий 96 пробирок со смесью для амплификации, рассчитан на проведение 36 определений неизвестных образцов (в двух повторах каждый).

2.3 Состав набора

Набор состоит из следующих комплектов:

1. Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК) включает:

- лизирующий раствор – 1 флакон (30 мл);
- реагент для преципитации – 1 флакон (40 мл);
- промывочный раствор №1 – 1 флакон (50 мл);
- промывочный раствор №2 – 1 флакон (30 мл);
- буфер для растворения – 4 пробирки (по 1,25 мл);
- отрицательный контрольный образец – 2 пробирки (по 1,5 мл);
- внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл).

2. Калибровочные образцы:

- HCV–РНК–СТ1 ($1,0 \times 10^6$ копий/мл) – 5 пробирок (по 300 мкл);
- HCV–РНК–СТ2 ($3,0 \times 10^3$ копий/мл) – 5 пробирок (по 300 мкл).

3. Комплект реагентов для обратной транскрипции
включает:

- буферный раствор для обратной транскрипции «ОТ-буфер» – 1 пробирка (200 мкл);
- смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) и праймеров для обратной транскрипции «Праймеры ОТ-NAV+HCV+HDV+HGV+HIV+дНТФ» – 1 пробирка (100 мкл);
- обратную транскриптазу – 1 пробирка (50 мкл).

4. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации
включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 96 пробирок (по 20 мкл);
- полимеразу ТехноТaq – 1 пробирка (50 мкл);
- ПЦР-буфер – 2 пробирки (по 500 мкл);
- положительный контрольный образец ДНК – 1 пробирка (150 мкл).

2.4 Время проведения анализа (с учётом пробоподготовки) – от 5 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая специфичность: набор реагентов выявляет следующие генотипы HCV: 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 2i, 3, 4, 5a, 6.

В исследуемых образцах, содержащих РНК вируса гепатита С, определяется концентрация РНК вируса в исследуемом материале. В исследуемых образцах, не содержащих РНК HCV, детектирующий амплификатор регистрирует отрицательный результат.

Аналитическая чувствительность: 200 копий РНК HCV на 1,0 мл плазмы.

Линейный диапазон концентраций РНК HCV, определяемых детектирующим амплификатором, составляет $7,5 \times 10^2$ – $1,0 \times 10^8$ копий/мл образца.

Коэффициент вариации результатов определений – не более 7%.

Диагностическая чувствительность: 99,8%.

Диагностическая специфичность: 100%.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569–09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» и санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3 3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

Утилизировать неиспользованные реактивы, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты и биологический материал необходимо в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Примечание - Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный требуются следующие оборудование и материалы:

- бокс биологической (микробиологической) безопасности II класса;
- ПЦР-бокс;
- амплификатор Rotor-Gene Q (Qiagen);
- центрифуга для микропробирок, с RCF не ниже 16 000 x g;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 40 °C до 95 °C;
- микроцентрифуга-вортекс;
- аспиратор с колбой-ловушкой для удаления надсадочных жидкостей;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками;
- вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette с ЭДТА или цитратом натрия;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл, 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости 2,0-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;

- одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для аспиратора с колбой ловушкой;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- контейнер с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

6.1 Взятие образцов периферической крови

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объёмом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2–3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала

ВНИМАНИЕ! Время от взятия материала до получения плазмы не должно превышать 6 часов.

Транспортировать и хранить образцы крови до начала исследования при температуре от 2 °С до 8 °С.

ВНИМАНИЕ! Цельную кровь нельзя замораживать.

6.3 Получение плазмы крови

- 6.3.1 Пробирки с кровью центрифугируйте при 3000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).
- 6.3.2 После центрифугирования отберите дозатором верхнюю фракцию (плазма) и перенесите в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

Допускается хранение полученной плазмы при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более 3 месяцев.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение РНК из плазмы крови

Примечания

1. Перед началом работы необходимо достать из холодильника комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот и проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе. В случае выпадения осадка лизирующий раствор прогреть при 65 °С до полного растворения осадка. Затем перемешать лизирующий раствор переворачиванием флакона вверх дном 5-10 раз, избегая пенообразования.
 2. На данном этапе используйте только наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.
 3. Для повышения достоверности получаемых результатов на этапе выделения РНК исследуемые образцы необходимо продублировать (для одного исследуемого образца провести две отдельные пробоподготовки).
- 7.1.1 Для исследования промаркируйте следующее количество пластиковых пробирок объемом 1,5 мл (таблица 2):
- по 2 пробирки на каждый исследуемый образец плазмы;
 - одну пробирку для отрицательного контрольного образца (К-);
 - 3 пробирки для калибровочного образца HCV-РНК-СТ1 (СТ1);

- 3 пробирки для калибровочного образца HCV-РНК-СТ2 (СТ2).

Пример: Для исследования 10 образцов необходимо промаркировать 27 пробирок (20 пробирок для исследуемых образцов, одну пробирку для «К-», 3 пробирки для «СТ1» и 3 пробирки для «СТ2».

Таблица 2 - Пример маркировки пробирок для проведения пробоподготовки

Образец плазмы	«К-»	HCV-РНК-СТ1	HCV-РНК-СТ2
Пробирка №1	Пробирка «К-»	Пробирка «СТ1-1»	Пробирка «СТ2-1»
Пробирка №2		Пробирка «СТ1-2»	Пробирка «СТ2-2»
		Пробирка «СТ1-3»	Пробирка «СТ2-3»

ВНИМАНИЕ! Пробирки с калибровочными образцами, отрицательный контрольный образец и пробирки с анализируемыми образцами необходимо обрабатывать по единой схеме.

7.1.2 Внесите во все промаркированные пробирки, кроме «СТ1» и «СТ2», по 10 мкл предварительно перемешанного внутреннего контрольного образца (РНК-ВК).

7.1.3 Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки. Закройте крышки пробирок.

Примечание - Для предотвращения контаминации следует перед внесением образцов открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего.

7.1.4 Внесите по 100 мкл предварительно перемешанной плазмы крови в пробирки для исследуемых образцов. В пробирку,

промаркированную «К-», внесите 100 мкл отрицательного контрольного образца, в пробирки, маркированные «СТ1», «СТ2» – по 100 мкл соответствующего калибровочного образца.

- 7.1.5 Плотнo закройте крышки пробирок, встряхните на вортeксе в течение 3–5 с дважды и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с при комнатной температуре.
- 7.1.6 Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 15 мин, осадите конденсат центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.
- 7.1.7 Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхните на вортeксе в течение 3–5 с дважды.
- 7.1.8 Центрифугируйте пробирки при 13 000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре.
- 7.1.9 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.1.10 Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1. Пробирки аккуратно встряхните на вортeксе в течение 1-3 с. Затем 3–5 раз аккуратно переверните пробирки, омывая внутреннюю поверхность крышки.
- 7.1.11 Центрифугируйте пробирки при 13 000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.1.12 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.1.13 Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закройте крышки пробирок.

Аккуратно переверните пробирки вверх-вниз, омывая стенки и крышку пробирки. Необходимо проделывать эту процедуру для каждой пробирки индивидуально.

- 7.1.14 Центрифугируйте пробирки при 13 000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.1.15 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.1.16 Откройте крышки пробирок и высушите осадок при температуре 65 °С в течение 5 мин.
- 7.1.17 Добавьте к осадку 16,5 мкл буфера для растворения. Осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3–5 с.
- 7.1.18 Прогрейте пробирки при температуре 65 °С в течение 10 мин. Осадите капли центрифугированием пробирок при 13 000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

Полученный препарат РНК необходимо в течение 30 мин использовать для постановки реакции обратной транскрипции, так как препарат РНК не подлежит хранению.

7.2 Проведение реакции обратной транскрипции

- 7.2.1 Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-HAV+HCV+HDV+HGV+HIV+дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при температуре от 18 °С до 25 °С, затем встряхните пробирки на вортексе и центрифугируйте при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с.

Примечание - В случае выпадения осадка в буферном растворе «ОТ-буфер» пробирку следует оставить при комнатной температуре до полного растворения осадка, периодически встряхивая на вортексе.

- 7.2.2 Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:
- 2,0 x (N+1) мкл буферного раствора «ОТ-буфер»;
 - 1,0 x (N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ-HAV+HCV+HDV+HGV+HIV+дНТФ»;
 - 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы;

где N – количество промаркированных пробирок с учетом «К-», «СТ1», «СТ2».

Пример: Необходимо проанализировать 10 образцов. Промаркированных пробирок – 27. Нужно приготовить смесь ОТ-буфера, праймеров и обратной транскриптазы для 28 (27+1) пробирок, т.е. 56 мкл ОТ-буфера + 28 мкл праймеров + 14 мкл обратной транскриптазы.

ВНИМАНИЕ! Обратную транскриптазу необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.3 Встряхните пробирку с ОТ-смесью на вортексе и центрифугируйте в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.4 Добавьте по 3,5 мкл ОТ-смеси во все промаркированные пробирки (включая «К-», «СТ1» и «СТ2») и перемешайте пипетированием 5–7 раз.

7.2.5 Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40 °С в течение 30 мин, затем прогрейте при 95 °С в течение 5 мин.

Примечание – Рекомендуются использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, «Гном» (ООО «НПО ДНК-Технология»)).

7.2.6 Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

7.2.7 Препарат кДНК допускается хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

Примечание - Для постановки ПЦР образцы кДНК, хранившиеся при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С, необходимо разморозить при комнатной температуре или при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.3 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

7.3.1 Промаркируйте необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для

исследуемых образцов плазмы крови, отрицательного контрольного образца (К-), положительного контрольного образца ДНК (К+) и по три пробирки для калибровочных образцов (СТ1 и СТ2) (таблица 3).

Пример: Необходимо проанализировать 10 образцов. Нужно промаркировать 20 пробирок для исследуемых образцов; одну пробирку для «К-»; три пробирки для «СТ1», три пробирки для «СТ2» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 28.

Таблица 3 - Пример маркировки пробирок для проведения ПЦР

Образец плазмы	«К-»	HCV-PHK-СТ1	HCV-PHK-СТ2	«К+»
Пробирка №1	Пробирка «К-»	Пробирка «СТ1-1»	Пробирка «СТ-2-1»	Пробирка «К+»
Пробирка №2		Пробирка «СТ1-2»	Пробирка «СТ2-2»	
		Пробирка «СТ1-3»	Пробирка «СТ2-3»	

ВНИМАНИЕ! Маркировку следует наносить только на крышки пробирок!

7.3.2 Разморозьте при комнатной температуре ПЦР-буфер из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации.

7.3.3 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq на вортексе в течение 3–5 с, затем центрифугируйте в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.4 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq Смешайте в отдельной пробирке:

- 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера;

- 0,5 x (N+1) мкл полимеразы ТехноТaq;

где N – количество промаркированных пробирок с учетом «К-», «СТ1», «СТ2», «К+».

Пример: Необходимо проанализировать 10 образцов. Промаркированных пробирок – 28. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq для 29 (28+1) пробирок, т.е. 290 мкл ПЦР-буфера + 14,5 мкл полимеразы ТехноТaq.

- 7.3.5 Перемешайте смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq на вортексе и осадите капли центрифугированием в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.

Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq допускается хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного часа.

- 7.3.6 Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq.

- 7.3.7 Встряхните пробирки с препаратом кДНК/ДНК исследуемых образцов, калибровочных образцов, «К-» и «К+» на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.

- 7.3.8 Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК/ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты кДНК/ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (по две пробирки для каждого образца).

- 7.3.9 Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК и реакцию обратной транскрипции, в

пробирку, промаркированную «K-». Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца ДНК, в пробирку, промаркированную «K+».

7.3.10 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл «ДНК соответствующего калибровочного образца в пробирки, маркированные «СТ1» и «СТ2» (по три пробирки для каждого калибровочного образца).

7.3.11 Центрифугируйте пробирки в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.

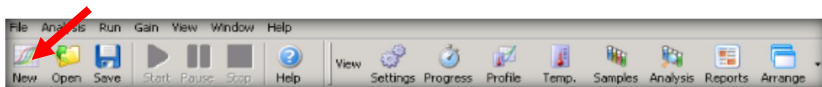
7.3.12 Установите все пробирки в карусель амплификатора, наденьте прижимное кольцо. Проверьте, чтобы карусель была сбалансирована при работе прибора. Номера мест для пробирок в карусели будут соответствовать номерам образцов в программе амплификатора.

7.3.13 Запустите программное обеспечение. Для проведения ПЦР создайте и запустите новый файл (см. 7.4).

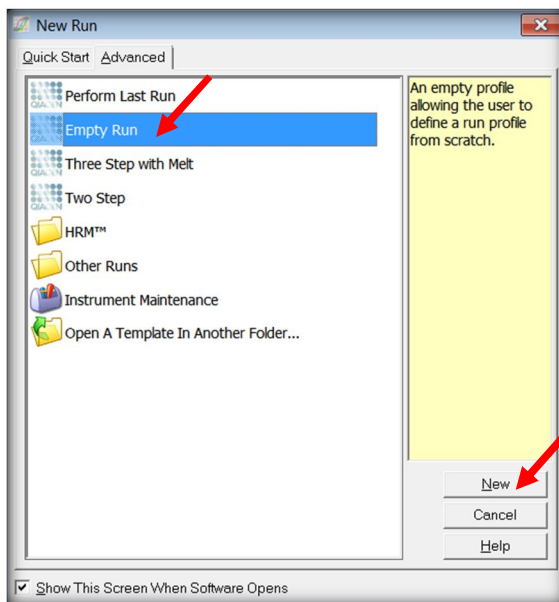
7.4 Создание и запуск файла

Создание нового файла в программе амплификации необходимо производить в следующем порядке:

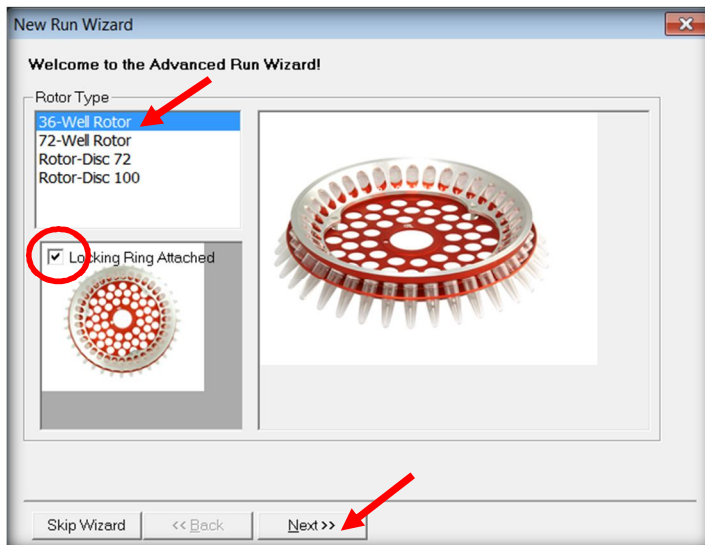
7.4.1 Откройте программу амплификации, нажмите кнопку «New» в основном меню программы.



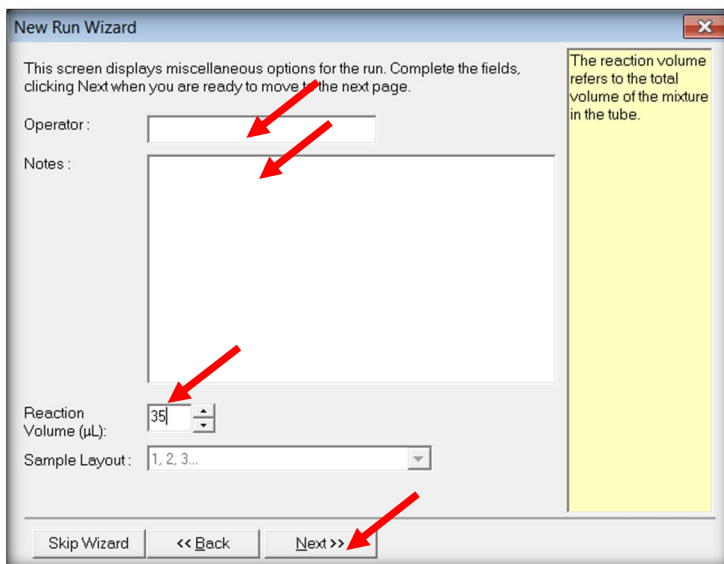
7.4.2 В появившемся окне выберите шаблон запуска «Advanced». Выделите «Empty Run», нажмите кнопку «New».



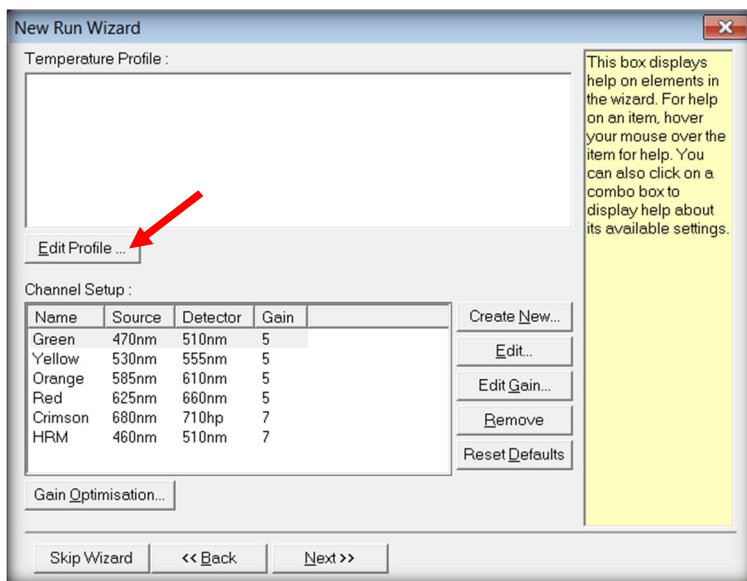
- 7.4.3 В открывшемся окне выберите 36-луночную карусель. Проверьте, чтобы прижимное кольцо было закреплено правильно, в противном случае его срыв может повредить прибор. Нажмите кнопку «Next».



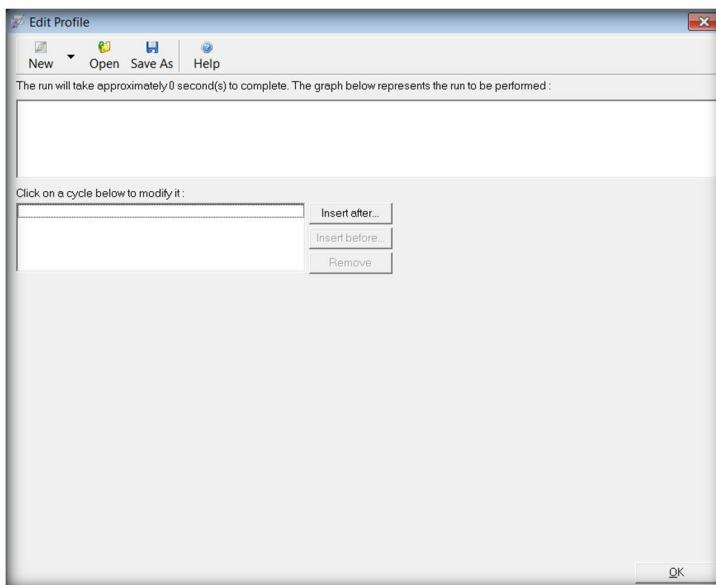
7.4.4 В открывшемся окне задайте имя оператора, описание эксперимента и объём реакционной смеси (35 мкл). Нажмите кнопку «Next».



7.4.5 В следующем окне создайте температурный профиль. Для этого нажмите кнопку «Edit Profile».



7.4.6 Нажмите кнопку «Insert after», выберите «New Cycling».

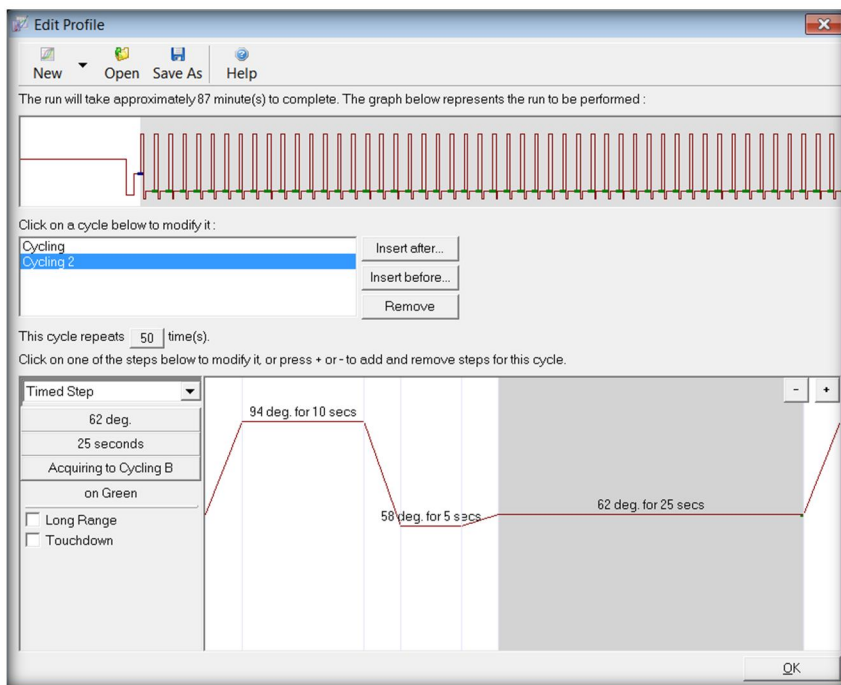


7.4.7 Создайте температурный профиль эксперимента (таблица 4).

Для этого с помощью «This cycle repeats» задайте количество циклов в соответствующем циклировании. Кнопками «+» или «-» можно добавлять или удалять температурные полки. Для редакции параметров температурных полок выделите соответствующий шаг и используйте кнопки «deg.» (градусы), «seconds» (время в секундах).

Таблица 4 - Режим амплификации

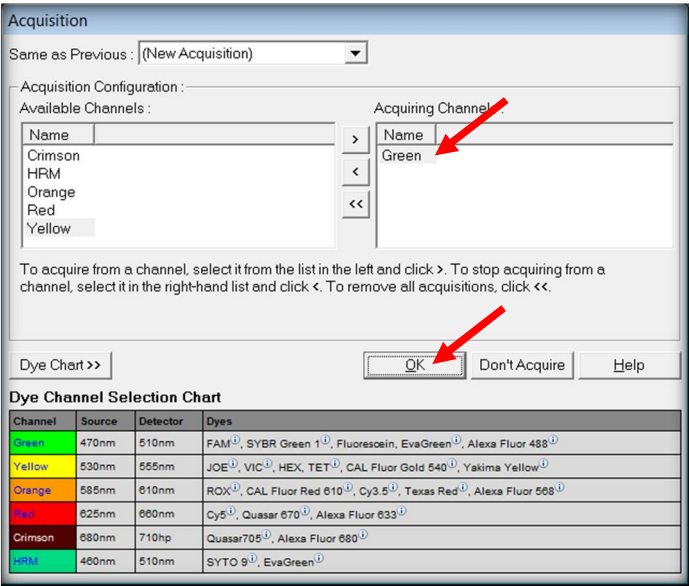
№ /Cycling	Температура /Temperature	Время /Hold Time	Количество циклов /Cycle Repeats
Cycling	80 °C	300 sec	1 time
Cycling 2	94 °C	10 sec	50 times
	58 °C	5 sec	
	62 °C*	25 sec	



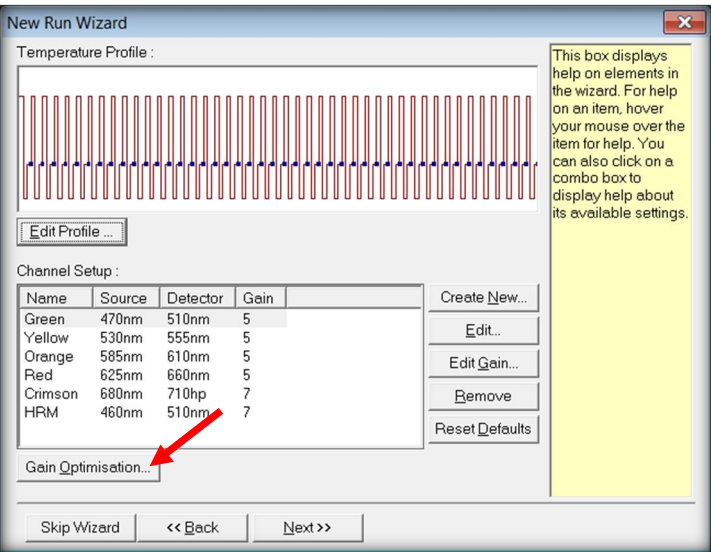
7.4.8 Для добавления канала детекции в соответствующем шаге нажмите кнопку «Not Acquiring» и стрелками переместите название нужных каналов «Green» и «Yellow» в правое окно.

* – установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам Green (FAM) и Yellow (HEX) при 62 °C.

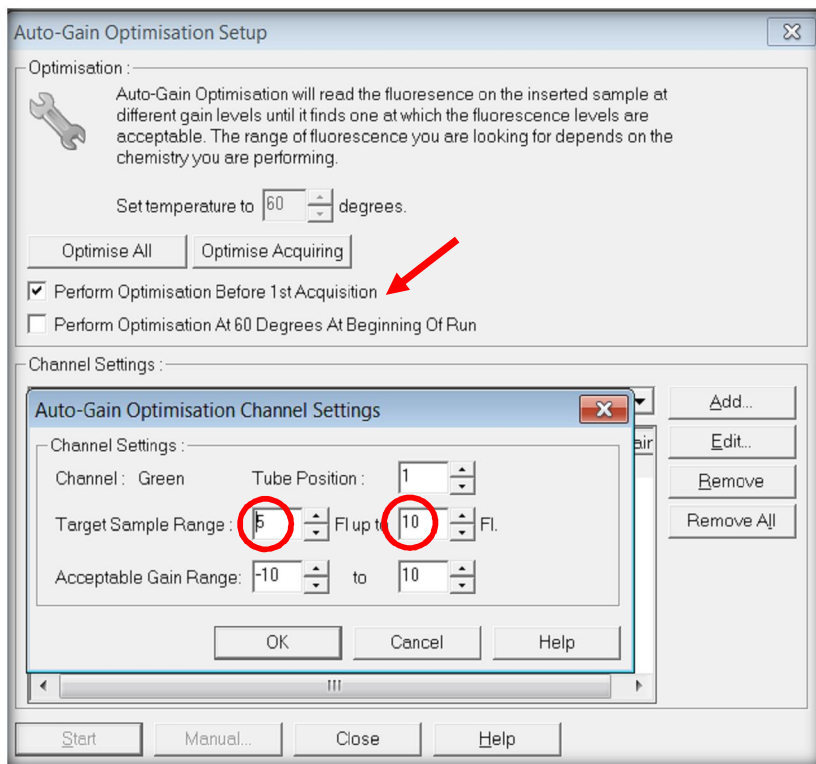
После выбора температурного профиля эксперимента нажмите кнопку «OK».



7.4.9 В следующем окне нажмите кнопку «Gain Optimisation...».

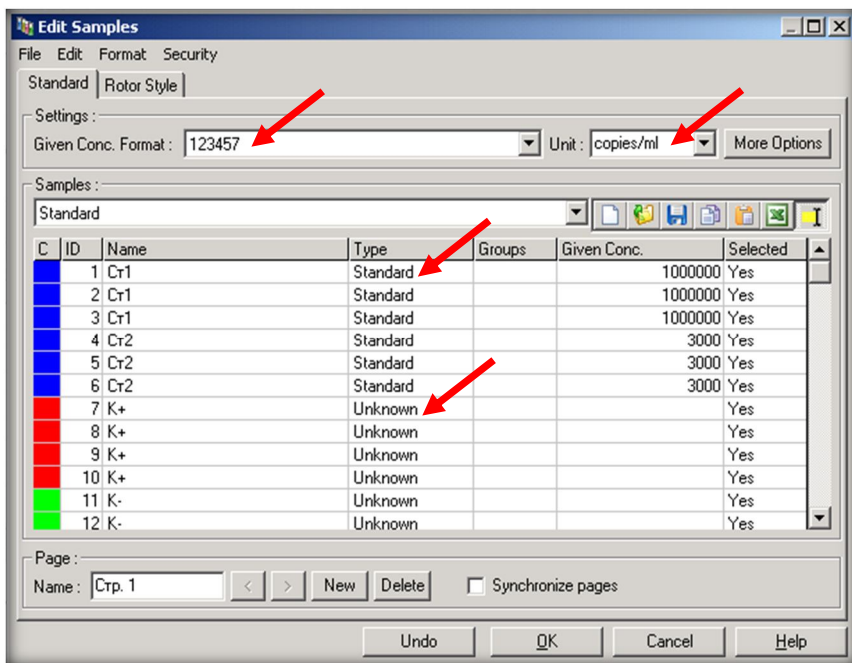


- 7.4.10 В пункте меню «Channel Settings» выберите каналы «Green» и «Yellow». Установите «Tube Position» 1, «Target Sample Rang» 5 FI up to 10 FI. Установите галочку «Perform Optimisation Before 1st Acquisition», нажмите «Close».



- 7.4.11 Нажмите кнопку «Next» и запустите амплификацию кнопкой «Start Run». Назовите файл и сохраните его на диске.

Примечание - В любое время работы с данным файлом возможно редактирование образцов. Номера пробирок в карусели амплификатора должны соответствовать номерам образцов в протоколе. Все клинические образцы, положительные и отрицательные контрольные образцы следует обозначать как «Unknown». Стандарты необходимо обозначать как «Standard». В графе «Given Conc.» следует указать концентрацию стандартов, выбрав размерность copies/ml.



8 РЕГИСТРАЦИЯ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

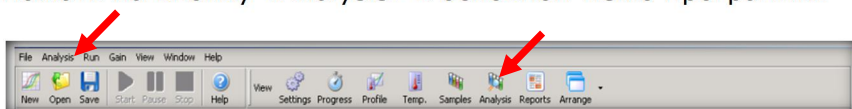
Регистрация сигнала проводится прибором во время амплификации.

Детекция и учёт результатов осуществляются амплификатором автоматически.

Продукты амплификации специфических фрагментов ДНК детектируются по каналу «Green». Амплификация внутреннего контроля детектируется по каналу «Yellow».

Для проведения анализа необходимо:

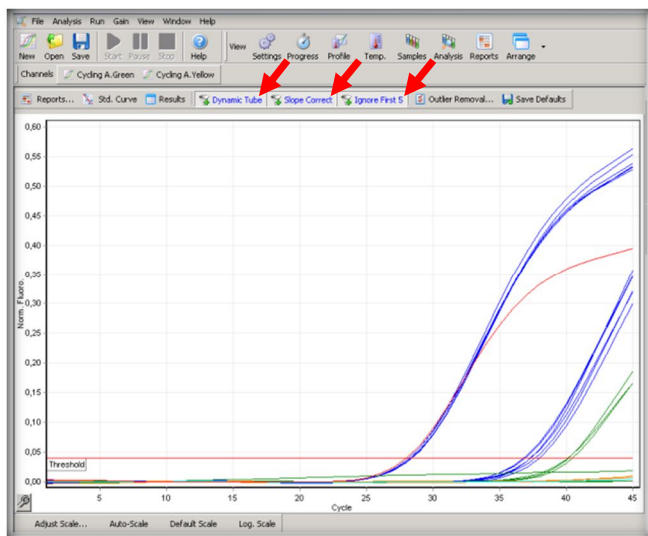
8.1 Нажать на кнопку «Analysis» в основном меню программы.



- 8.2** Выбрать «Cycling A Green», нажать «Show». Выбрать «Cycling A Yellow», нажать «Show».

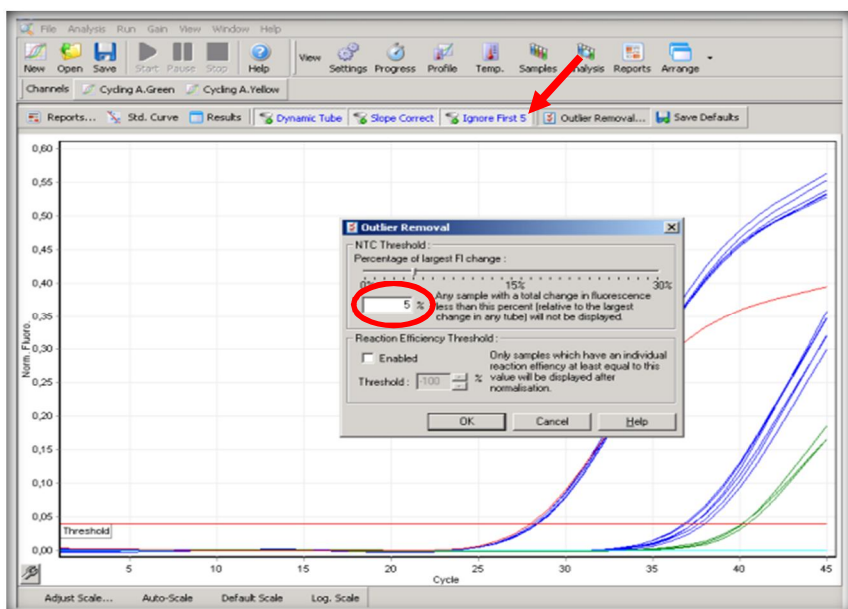


- 8.3** В меню основного окна нажать кнопки «Dynamic tube», «Slope Correct», «Linear Scale».

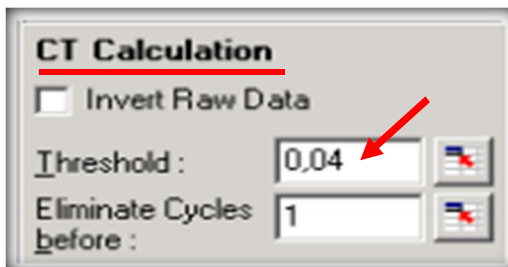


8.4 В меню «Ignore First» установить «5».

8.5 В меню «Quant. Removal» установить значение NTC threshold 5%.

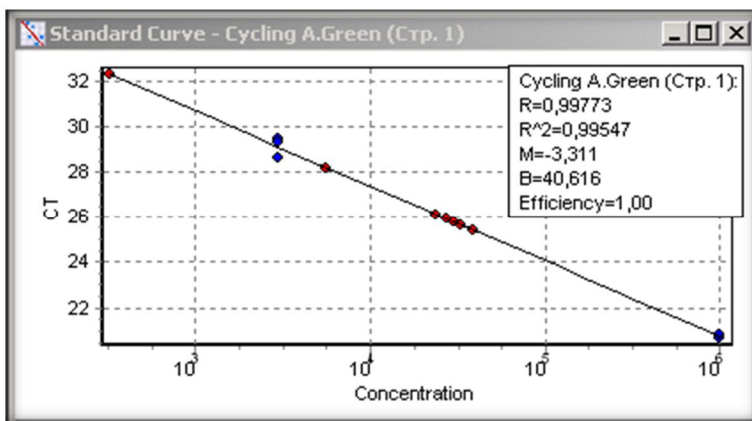


- 8.6** Активировать окно «Cycling A Green». Установить Threshold для всех каналов 0,04. Активировать окно «Cycling A Yellow». Установить Threshold для всех каналов 0,04.



В таблице «Quant. Results» появятся значения Ct для каждого образца. Прибор автоматически построит калибровочную прямую и определит концентрацию вируса в анализируемых образцах.

Калибровочная прямая вызывается на экран кнопкой «Std.Curve».



9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Эффективность должна составлять 0,93–1,03.

Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5 – Интерпретация результатов ПЦР

Выбранный флуорофор		Интерпретация результата
Fam/Green значение в диапазоне, копий/мл	Hex/Yellow (Ct)	
Анализируемые образцы		
7,5x10 ² – 1,0x10 ⁸	Не учитывается	Положительный результат с указанием вирусной нагрузки в образце (копий/мл)
Менее 7,5x10 ²	Не учитывается	Положительный результат с указанием « менее 750 копий/мл » (без указания точного значения!)
Более 1,0x10 ⁸	Не учитывается	Положительный результат с указанием « более 10⁸ копий/мл » (без указания точного значения!)
Не указано	Ct <36	Результат отрицательный (концентрация не указана)
Не указано	Не указан или Ct>36	Результат недостоверный
Положительный контрольный образец		
3,0x10 ⁵ – 1,4x10 ⁶ *	Не указан	Положительный результат с указанием концентрации ДНК в образце (копий/мл)
Отрицательный контрольный образец		
Не указано	Ct <36	Результат отрицательный (концентрация не указана)

9.1 Недостоверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате РНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа;

* – если в положительном контрольном образце определяемая концентрация ДНК выходит за рамки диапазона $3,0 \times 10^5 - 1,4 \times 10^6$ копий/мл, необходимо повторить исследование.

несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае необходимо повторно провести ПЦР, либо выделение РНК, постановку обратной транскрипции и ПЦР для этого образца, либо взятие клинического материала у пациента (выполняется последовательно).

9.2 При получении недостоверного результата для положительного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.3 При получении положительного результата на наличие РНК HCV в отрицательном контрольном образце результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

10 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.

10.2 Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, положительного контрольного образца и калибровочных образцов следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности. Допускается хранение ПЦР-буфера при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора. Допускается многократное замораживание-оттаивание ПЦР-буфера.

10.3 Пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, калибровочные образцы, положительный контрольный образец и комплект реагентов для выделения

нуклеиновых кислот следует хранить в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора.

- 10.4** Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению.
- 10.5** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 10.6** Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 11.1** При использовании набора в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- 11.2** Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.
- 11.3** Упаковка набора реагентов (пробирки, грипперы) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 12.1** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 12.2** Срок годности набора – 9 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для количественного определения РНК вируса гепатита С (HCV) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) (ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское ш., д.125Ж, корпус 6, этаж 5, комн.14, тел./факс +7 (495) 640-17-71

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).











E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Адрес производителя и место производства:

ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская область, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.

Приложение А (справочное)

Символы, используемые при маркировке набора

	Только для in vitro диагностики
	Температурный диапазон
	Количество определений
	Годен до
	Серия набора
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Не допускается воздействие солнечного света
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению

Не предназначено для применения на территории Российской Федерации

Не предназначено для применения на территории Российской Федерации

ДНК-Технология

117587, г. Москва, Варшавское ш., д.125Ж, корпус 6, этаж 5, комн.14

Тел./факс +7 (495) 640-17-71

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный)

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный)

E-mail: hotline@dna-technology.ru