

Не предназначено для применения на территории Российской Федерации



## 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

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>1</b>  | <b>НАЗНАЧЕНИЕ .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>2</b>  | <b>ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА .....</b>   | <b>4</b>  |
| 2.1       | Принцип действия .....   | 4         |
| 2.2       | Количество тестов.....   | 6         |
| 2.3       | Состав набора .....  | 6         |
| 2.4       | Время проведения анализа.....  | 7         |
| <b>3</b>  | <b>АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ<br/>ХАРАКТЕРИСТИКИ .....</b>            | <b>7</b>  |
| <b>4</b>  | <b>МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>5</b>  | <b>ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....</b>                                       | <b>9</b>  |
| <b>6</b>  | <b>АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....</b>  | <b>10</b> |
| 6.1       | Взятие образцов периферической крови.....                                  | 10        |
| 6.2       | Транспортирование и хранение исследуемого материала.....                   | 10        |
| 6.3       | Получение плазмы крови .....   | 11        |
| <b>7</b>  | <b>ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....</b>   | <b>11</b> |
| 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        |
| <b>8</b>  | <b>РЕГИСТРАЦИЯ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ<br/>АМПЛИФИКАЦИИ.....</b>              | <b>26</b> |
| <b>9</b>  | <b>УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.....</b>                       | <b>29</b> |
| <b>10</b> | <b>УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И<br/>ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА .....</b> | <b>31</b> |
| <b>11</b> | <b>УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>12</b> | <b>ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>13</b> | <b>АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ.....</b>  | <b>33</b> |
|           | <b>ПРИЛОЖЕНИЕ.....</b>   | <b>34</b> |

## **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 Taq-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, используемых для детекции продукта амплификации искомой кДНК, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зондов, используемых 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 °С до 95 °С;
- 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 – Рекомендуется 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-»          | НСV-РНК-СТ1      | НСV-РНК-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 ТехноТақ;

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 ТехноТақ для 29 (28+1) пробирок, т.е. 290 мкл ПЦР-буфера + 14,5 мкл полимеразы ТехноТақ.

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

Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ 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 ТехноТақ.

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

7.3.10 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл кДНК 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).

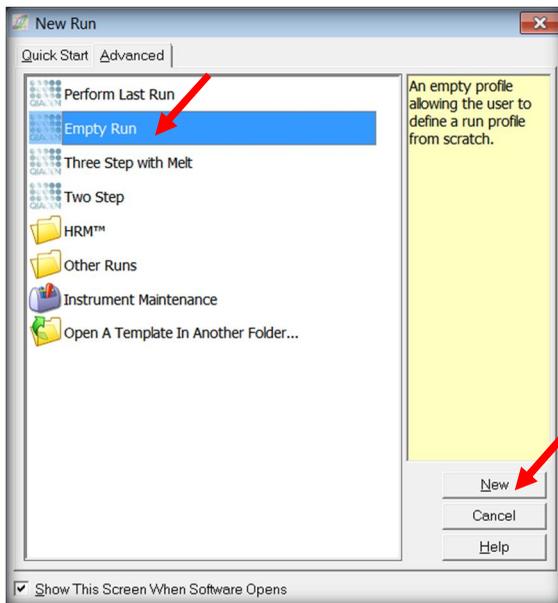
#### 7.4 Создание и запуск файла

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

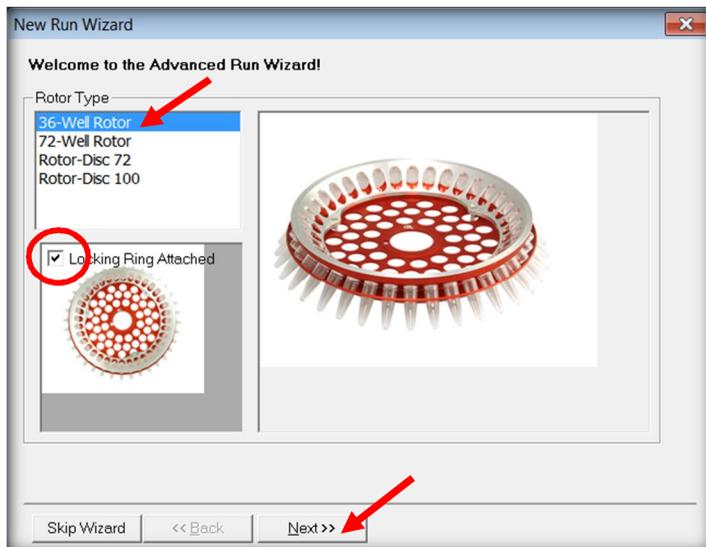
7.4.1 Откройте программу амплификации, нажмите кнопку «New» в основном меню программы.



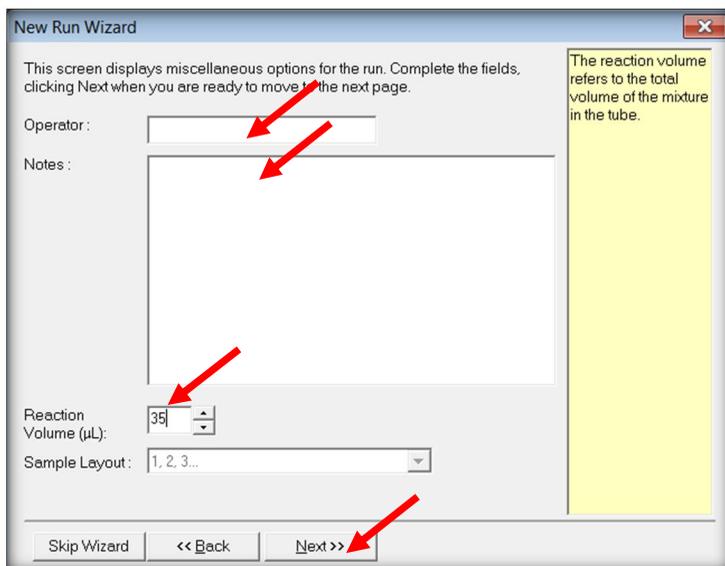
7.4.2 В появившемся окне выберите шаблон запуска «Advanced». Выделите «Empty Run», нажмите кнопку «New».



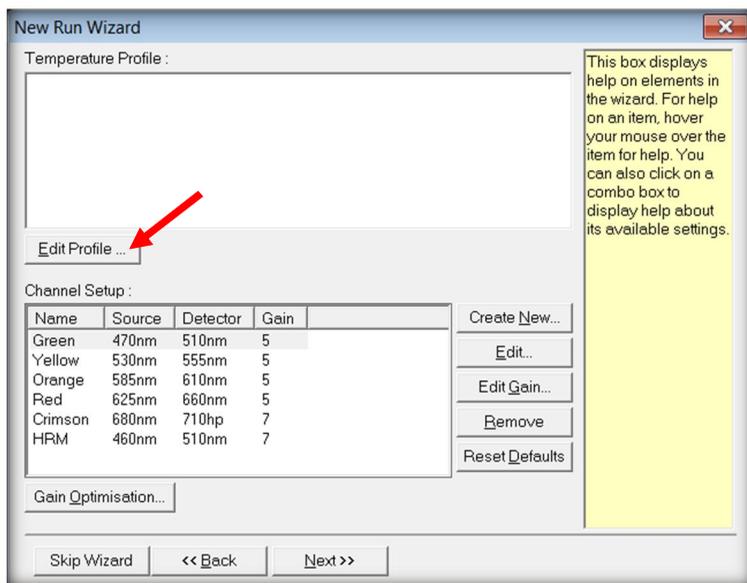
- 7.4.3 В открывшемся окне выберите 36-луночную карусель. Проверьте, чтобы прижимное кольцо было закреплено правильно, в противном случае его срыв может повредить прибор. Нажмите кнопку «Next».



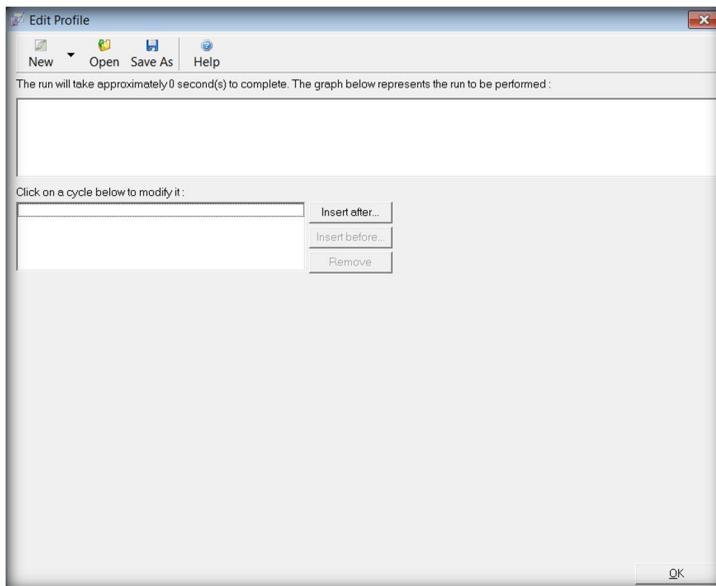
7.4.4 В открывшемся окне задайте имя оператора, описание эксперимента и объем реакционной смеси (35 мкл). Нажмите кнопку «Next».



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».

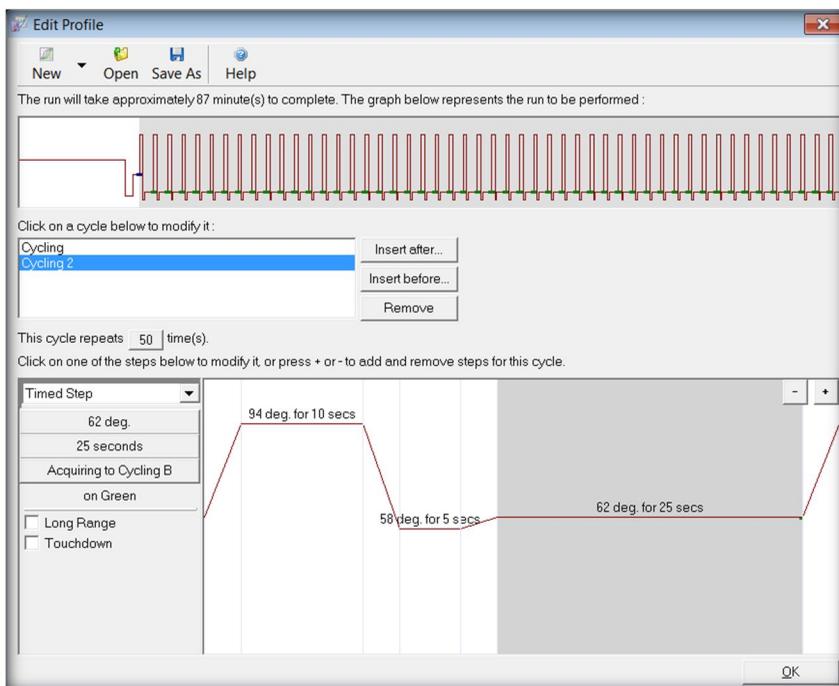


#### 7.4.7 Создайте температурный профиль эксперимента (таблица 4).

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

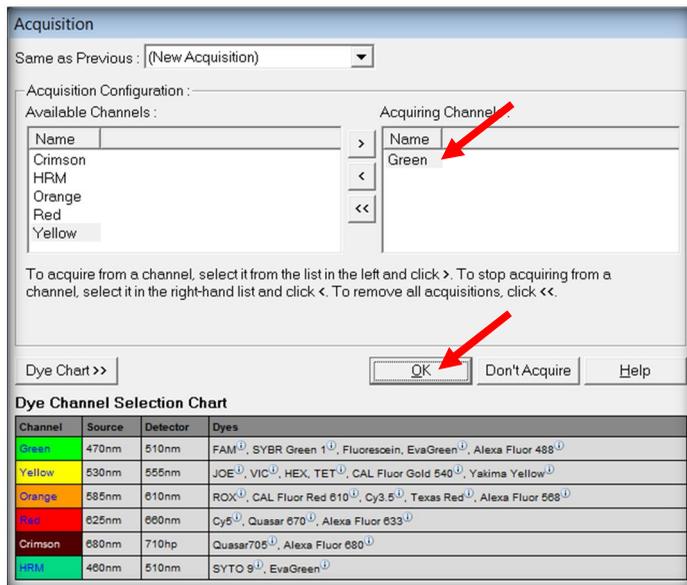
| № /Cycling | Температура /Temperature | Время /Hold Time | Количество циклов /Cycle Repeats |
|------------|--------------------------|------------------|----------------------------------|
| Cycling    | 80 °C                    | 300 sec          | 1 time                           |
| Cycling 2 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



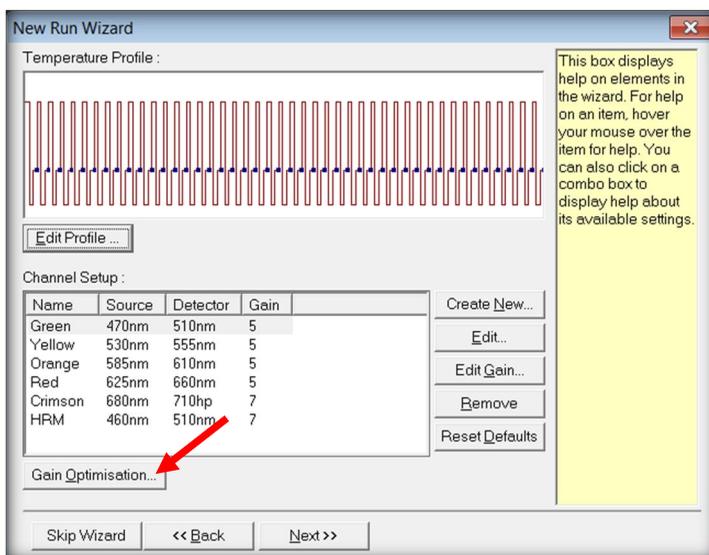
7.4.8 Для добавления канала детекции в соответствующем шаге нажмите кнопку «Not Acquiring» и стрелками переместите название нужных каналов «Green» и «Yellow» в правое окно.

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

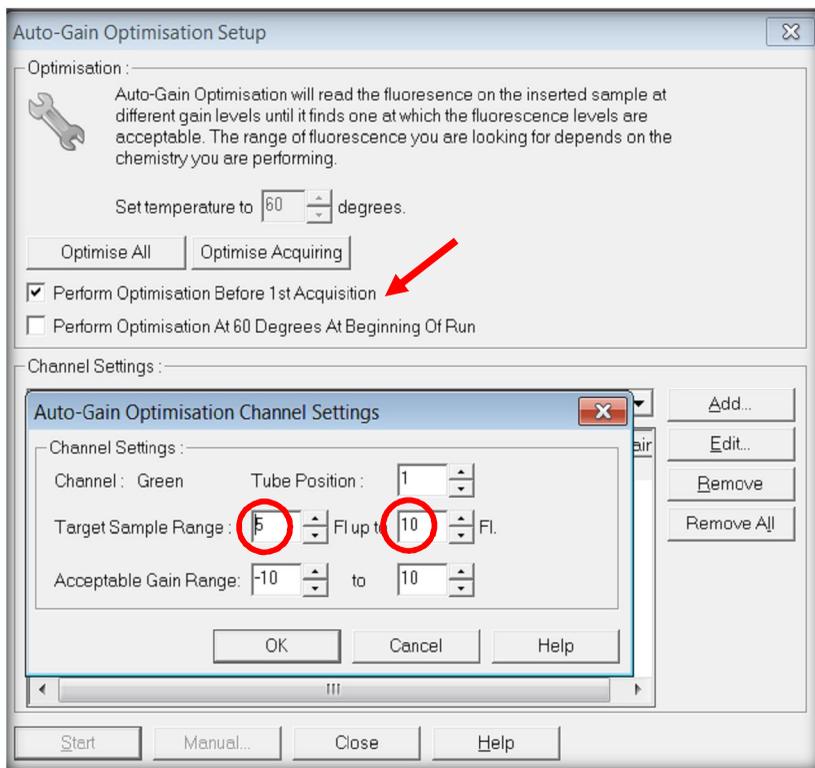
После выбора температурного профиля эксперимента нажмите кнопку «OK».



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

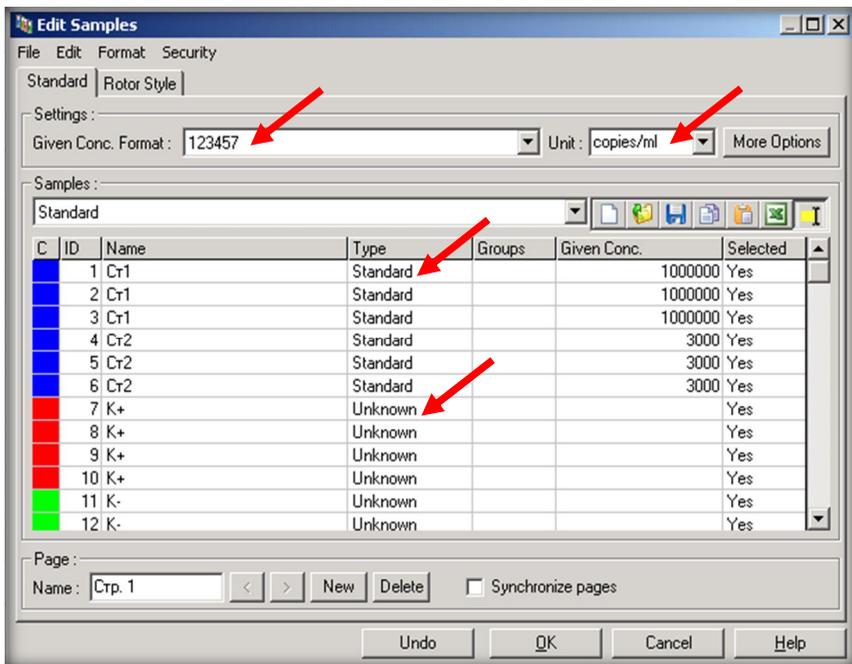


- 7.4.10 В пункте меню «Channel Settings» выберите каналы «Green» и «Yellow». Установите «Tube Position» 1, «Target Sample Rang» 5 FI up to 10 FI. Установите галочку «Perform Optimisation Before 1st Acquisition», нажмите «Close».



- 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:

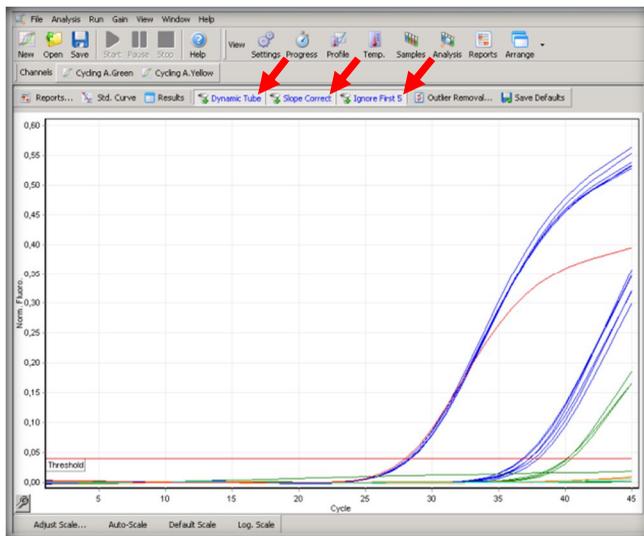
### 8.1 Нажать на кнопку «Analysis» в основном меню программы.



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

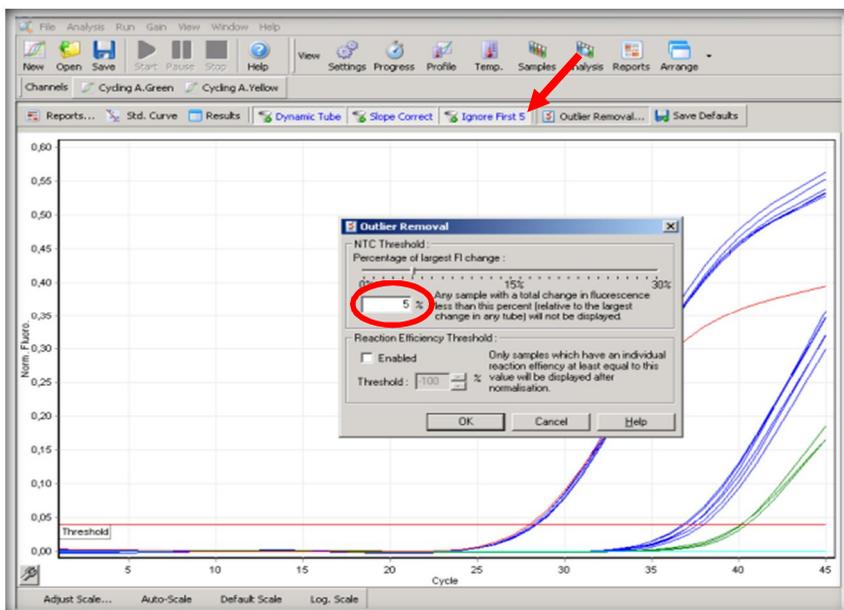


- 8.3** В меню основного окна нажать кнопки «Dynamic tube», «Slope Correct», «Linear Scale».

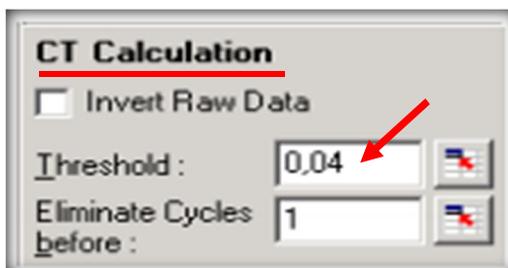


**8.4** В меню «Ignore First» установить «5».

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

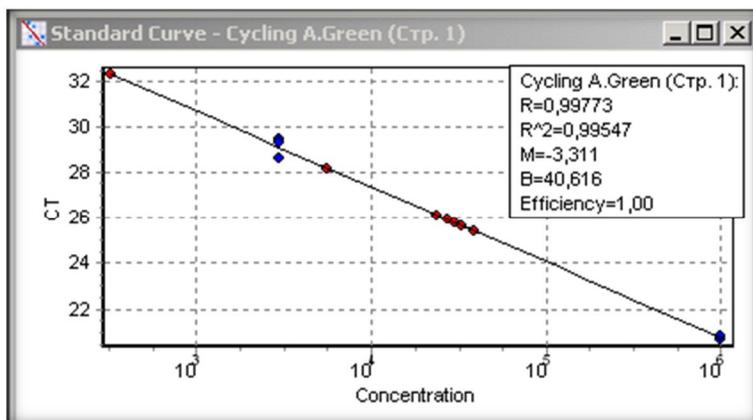


- 8.6** Активировать окно «Cycling A Green». Установить Threshold для всех каналов 0,04. Активировать окно «Cycling A Yellow». Установить Threshold для всех каналов 0,04.



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<br>значение в диапазоне,<br>копий/мл | Hex/Yellow (Ct)     |   |
| <b>Анализируемые образцы</b>                   |                     |   |
| <b>7,5x10<sup>2</sup> – 1,0x10<sup>8</sup></b> | Не учитывается      | Положительный результат с указанием вирусной нагрузки в образце (копий/мл)                                    |
| Менее <b>7,5x10<sup>2</sup></b>                | Не учитывается      | Положительный результат с указанием « <b>менее 750 копий/мл</b> » (без указания точного значения!)            |
| Более <b>1,0x10<sup>8</sup></b>                | Не учитывается      | Положительный результат с указанием « <b>более 10<sup>8</sup> копий/мл</b> » (без указания точного значения!) |
| Не указано                                     | Ct <36              | Результат отрицательный (концентрация не указана)   |
| Не указано                                     | Не указан или Ct>36 | Результат недостоверный   |
| <b>Положительный контрольный образец</b>       |                     |   |
| 3,0x10 <sup>5</sup> – 1,4x10 <sup>6</sup> *    | Не указан           | Положительный результат с указанием концентрации ДНК в образце (копий/мл)                                     |
| <b>Отрицательный контрольный образец</b>       |                     |   |
| 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 3,0x10<sup>5</sup> – 1,4x10<sup>6</sup> 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 клинично-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](mailto:hotline@dna-technology.ru), [www.dna-technology.ru](http://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](mailto:hotline@dna-technology.ru)