

УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека

« 25 » _____ В.В. Малеев
_____ 2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления и дифференциации генотипов вируса гепатита

C (HCV) в клиническом материале методом полимеразной

цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной

детекцией в режиме «реального времени»

«АмплиСенс® HCV-генотип-FL»

АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	11
ФОРМАТ FRT	13
СОСТАВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	16
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	16
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ	17
А. ПОДГОТОВКА ПРОБИРОК ДЛЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ	17
Б. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ.....	18
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	19
А. ПОДГОТОВКА ПРОБИРОК ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ	19
А1. ПОДГОТОВКА ПРОБИРОК ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ «ПЦР-КОМПЛЕКТ» ВАРИАНТ FRT-G1-4	20
А2. ПОДГОТОВКА ПРОБИРОК ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ «ПЦР-КОМПЛЕКТ» ВАРИАНТ FRT-G1-6	22
Б. ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	24
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	26
СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	30
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	30
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ЭКСТРАКЦИЯ РНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ «РИБО-СОРБ».....	32
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. ЭКСТРАКЦИЯ РНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ «РИБО-ПРЕП»	34
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	36

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	– комплиментарная ДНК
РНК	– рибонуклеиновая кислота
ОТ	– обратная транскрипция
ВКО	– внутренний контрольный образец
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПКО	– положительный контрольный образец
К+	- положительный контроль ПЦР
К–	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
<i>HCV</i>	– вирус гепатита С
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® HCV-генотип-FL»** предназначен для выявления и дифференциации генотипов вируса гепатита С (*HCV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Определение генотипов *HCV* 1a, 1b, 2, 3a, 4 проводится с помощью «ПЦР- комплекта» вариант FRT-g1-4; определение генотипов *HCV* 1a, 1b, 2, 3a, 4, 5a, 6 проводится с помощью «ПЦР-комплекта» вариант FRT-g1-6.

Данный набор реагентов рекомендуется использовать после обнаружения РНК *HCV* в исследуемых образцах с помощью наборов реагентов, предназначенных как для качественного, так и для количественного определения РНК вируса гепатита С (например, **«АмплиСенс® HCV-FL»**, использующего гибридационно-флуоресцентную детекцию, или **«АмплиСенс® HCV-EPh»**, использующего электрофоретическую детекцию продуктов амплификации (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)).

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в

комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из плазмы крови совместно с рекомбинантным внутренним контрольным образцом (ВКО), проведении реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для исключения ложноотрицательных результатов в исследование введен ВКО, который позволяет контролировать все этапы анализа и оценивать влияние ингибиторов ПЦР на результаты исследования.

Определение генотипа *HCV* одного образца проводится в нескольких пробирках, в каждой пробирке дифференцируются два генотипа *HCV* или один генотип *HCV* и ВКО. Набор разработан для приборов, имеющих два и более канала детекции флуоресценции. В таблице указаны каналы, по которым детектируются генотипы *HCV* для каждой реакционной смеси.

Реакционная смесь	1b/3a	1a/2	ВКО/4	5a/6 ²
Канал для флуорофора	Выявляемые генотипы <i>HCV</i>			
FAM	1b	1a	ВКО	5a
JOE	3a	2	4	6

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

² Входит в состав «ПЦР-комплекта» вариант FRT-g1-6.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате:

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 6 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-4.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-4.

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-4.

Форма 4 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-6.

Форма 5 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-6.

Форма 6 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-6.

Формы комплектации 1, 2, 3 предназначены для определения генотипов 1a, 1b, 2, 3a, 4 вируса гепатита С.

Формы комплектации 4, 5, 6 предназначены для определения генотипов 1a, 1b, 2, 3a, 4, 5a, 6 вируса гепатита С.

Формы комплектации 1, 2, 4, 5 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включая экстракцию РНК из клинического материала, проведение реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 3 и 6 предназначены для проведения ПЦР-амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для экстракции РНК (комплекты реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп») и проведения реакции обратной транскрипции (комплект реагентов «РЕВЕРТА-L»).

Формат FRT Форма 3: **REF** R-V1-G(1-4)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0253-1-3;

Форма 6: **REF** R-V1-G(1-6)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0256-1-3 / **VER** 25.04.17 / стр. 5 из 36

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Объём экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, МЕ/мл
100	«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-4, «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-6	2,5x10 ³
100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-4, «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-6	5x10 ³

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов показала отсутствие перекрестных реакций между генотипами 1a, 1b, 2, 3a, 4, 5a и 6 вируса гепатита С при использовании высококонцентрированных рекомбинантных положительных контрольных образцов и образцов плазмы крови соответствующих генотипов *HCV*.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии

с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в Зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром⁴. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

⁴ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, не включающих комплекты реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп»).

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

Формат FRT Форма 3: **REF** R-V1-G(1-4)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0253-1-3;

Форма 6: **REF** R-V1-G(1-6)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0256-1-3 / **VER** 25.04.17 / стр. 8 из 36

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, включающих комплекты реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп»).

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека (для всех форм комплектации):

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 1. Экстракция РНК из клинического материала

1. Комплекты реагентов для выделения РНК/ДНК – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО–преп» (ТУ 9398-071-01897593-08) или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 3, 6.
2. Ламинарный бокс.
3. Вортекс.
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс g.
5. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 50 мкл, от 20 до 200 мкл и от 100 до 1000 мкл).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
8. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл в штативах.
9. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой

для удаления надосадочной жидкости.

10. Одноразовые наконечники до 200 мкл в штативе.
11. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
12. Холодильник от 2 до 8 °С.
13. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
14. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2. Проведение реакции обратной транскрипции и амплификации в режиме «реального времени»

1. Комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции «РЕВЕРТА-L» (ТУ 9398-005-01897593-2008) – при работе с формами комплектации 3, 6.
2. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
3. Центрифуга/вортекс.
4. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 50 мкл и от 20 до 200 мкл).
5. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл и до 200 мкл в штативах.
6. Штативы для пробирок объемом 0,5 мл или 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемым типом пробирок).
7. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
8. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
9. Емкость для сброса наконечников.

При проведении реакции обратной транскрипции с использованием «РЕВЕРТА-L»:

10. Одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в зависимости от модели используемого термостата или амплификатора, в котором проводится реакция обратной транскрипции).
11. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С или программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США)).
12. При постановке реакции обратной транскрипции менее чем для 10 исследуемых образцов – автоматический дозатор

переменного объема (от 0,5 до 10 мкл).

13. При постановке реакции обратной транскрипции менее чем для 10 исследуемых образцов – одноразовые наконечники с фильтром до 10 мкл в штативе.

При работе с «ПЦР-комплексом»:

14. Программируемый амплификатор роторного типа (например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия)), или амплификатор планшетного типа (например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США)), или амплификатор SmartCycler II (Cepheid, США), или Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
15. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
- а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (нестрипованные или стрипованные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (нестрипованные) или стрипованные пробирки объемом 0,1 мл – при использовании прибора роторного типа.
 - в) пробирки для ПЦР объемом 0,025 мл (Cepheid, США) – при использовании прибора SmartCycler II (Cepheid, США).
16. Промаркированный штатив (при использовании приборов планшетного типа).
17. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР (плоская крышка, нестрипованные) на 0,5 мл
18. Центрифуга и штатив для пробирок (Cepheid, США) при использовании SmartCycler II (Cepheid, США).

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Для проведения ПЦР-исследования используется плазма периферической крови. Для получения плазмы кровь отбирают в пробирку с 3 % раствором ЭДТА из расчета 20:1 (20 частей крови на 1 часть ЭДТА). Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g, после чего отбирают плазму и переносят в отдельную одноразовую пробирку. Хранить плазму можно не более 3 дней при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 68 °С.

ФОРМАТ FRT

ФОРМАТ FRT СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ⁵	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ⁵	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли.

Входит в состав формы комплектации 1 и 4.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ⁵	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2 и 5.

⁵ При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 50 – комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
RT-G-mix-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	5 пробирок
RT-mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,125	5 пробирок
Ревертаза (MMIV)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на проведение 60 реакций обратной транскрипции, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-4 – комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК генотипов (1a, 1b, 2, 3a, 4) HCV с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FRT HCV генотипы 1b/3a	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FRT HCV генотипы 1a/2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FRT HCV ВКО/генотип 4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FER/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	3 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	3 пробирки
ПКО кДНК HCV генотипы 1b/3a	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО кДНК HCV генотипы 1a/2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО кДНК HCV ВКО/генотип 4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 тестов (165 реакций амплификации), включая контроли.

Входит в состав форм комплектации 1, 2 и 3.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ВКО STI-248-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-6 – комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК генотипов (1а, 1б, 2, 3а, 4, 5а, 6) *HCV* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FRT <i>HCV</i> генотипы 1b/3a	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FRT <i>HCV</i> генотипы 1a/2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FRT <i>HCV</i> ВКО/генотип 4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FRT <i>HCV</i> генотипы 5a/6	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	4 пробирки
ПКО кДНК <i>HCV</i> генотипы 1b/3a	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО кДНК <i>HCV</i> генотипы 1a/2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО кДНК <i>HCV</i> ВКО/генотип 4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО кДНК <i>HCV</i> генотипы 5a/6	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 тестов (220 реакций амплификации), включая контроли. Входит в состав форм комплектации 4, 5 и 6.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ВКО STI-248-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Проведение реакции обратной транскрипции.
- Проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в «Методических рекомендациях по применению набора реагентов для определения и дифференциации генотипов вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HCV-генотип-FL»», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора:

- при использовании комплекта реагентов «**РИБО-сорб**» порядок работы см. в **приложении 1** – «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб».
- при использовании комплекта реагентов «**РИБО-преп**» порядок работы см. в **приложении 2** – «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп».

ВНИМАНИЕ! Полученный препарат РНК хранению не подлежит, реакцию обратной транскрипции следует проводить сразу после получения РНК-пробы.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Общий объем реакционной смеси – 20 мкл, включая объем пробы РНК – 10 мкл.

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

А. Подготовка пробирок для обратной транскрипции

Для внесения в пробирки реагентов и проб РНК используются одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением реакции обратной транскрипции.

1. До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе **RT-mix** и **RT-G-mix-1**. Осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл (в зависимости от модели используемого термостата или амплификатора) для проведения реакции обратной транскрипции с учетом количества исследуемых и контрольных образцов (один контроль экстракции (ОК)). Промаркировать пробирки.
3. При проведении обратной транскрипции 10-12 образцов:
 - а) Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с **RT-mix** внести **5 мкл RT-G-mix-1**, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
 - б) К полученному раствору добавить **6 мкл ревертазы (MMiv)**, пипетировать 5 раз, перемешать на вортексе. Осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
4. При проведении обратной транскрипции менее чем 10 образцов:

Для приготовления реакционной смеси необходимо в

отдельной пробирке смешать реагенты из расчета на 1 реакцию в следующем порядке: **10 мкл RT-mix**, **0,4 мкл RT-G-mix-1** и **0,5 мкл ревертазы (MMIv)** (см. также табл. 1). При внесении в смесь **RT-G-mix-1** и **ревертазы (MMIv)** пипетировать каждый реагент не менее 5 раз. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

ВНИМАНИЕ! Ревертаза (MMIv) термочувствительна! Не оставляйте ее при комнатной температуре в течение длительного времени! Сразу после использования убирайте в морозильную камеру холодильника!

Таблица 1

Схема приготовления реакционной смеси

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	10,00	0,4	0,5
Число клинических образцов	RT-mix	RT-G-mix-1	Ревертаза (MMIv)
4	60 ⁶	2,4	3,0
5	70	2,8	3,5
6	80	3,2	4,0
7	90	3,6	4,5
8	100	4,0	5,0

5. Внести в приготовленные пробирки по **10 мкл** готовой реакционной смеси.
6. В готовые пробирки внести по **10 мкл РНК-проб**, выделенных из клинических и контрольных образцов, согласно маркировке. Осторожно перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

ВНИМАНИЕ! При добавлении РНК-проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

Б. Проведение реакции обратной транскрипции

1. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) на **37 °C** на **30 мин.**

⁶ Объемы вносимых реагентов приведены с учетом количества исследуемых образцов (клинические образцы и 1 контроль этапа выделения РНК) и запаса на 1 образец.

ВНИМАНИЕ! В случае использования для постановки реакции обратной транскрипции амплификаторов с системой детекции в режиме «реального времени» необходимо запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы (см. табл. 2 и «Методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HCV-генотип-FL»», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Таблица 2

Программа для проведения реакции обратной транскрипции для амплификаторов с системой детекции в режиме «реального времени»⁷

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	37	30 мин	–	1

2. После окончания реакции добавить в пробирки по **20 мкл ДНК-буфера**, используя новый наконечник с фильтром для каждой пробы. Перемешать аккуратно на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

Полученная в реакции обратной транскрипции кДНК используется для проведения ПЦР-амплификации.

Готовый препарат кДНК можно хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 нед или при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

Для внесения в пробирки реагентов, проб кДНК и

⁷ Например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия); Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия); iQ5 (Bio-Rad, США); Mx3000P (Stratagene, США); «ДТ-96» («ДНК-технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

Формат FRT Форма 3: **REF** R-V1-G(1-4)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0253-1-3;

Форма 6: **REF** R-V1-G(1-6)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0256-1-3 / **VER** 25.04.17 / стр. 19 из 36

контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно расчетной таблице (см. табл. 3, 4).

А1. Подготовка пробирок для амплификации при использовании комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-4

1. До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с учетом количества исследуемых и контрольных образцов (один контроль экстракции РНК, два контроля амплификации). Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора.

ВНИМАНИЕ! Каждый образец анализируется с использованием трех реакционных смесей, поэтому для каждого образца необходимо приготовить 3 пробирки. При использовании приборов роторного типа промаркировать пробирки «№ образца_1b/3a», «№ образца_1a/2» и «№ образца_ВКО/4», соответственно. При использовании приборов планшетного типа использовать для этих целей промаркированный штатив.

3. Отобрать три пробирки объемом 0,5 мл для приготовления реакционных смесей. Промаркировать пробирки «1b/3a», «1a/2» и «ВКО/4».
4. В каждую из трех пробирок, предназначенных для приготовления реакционных смесей, внести из расчета на 1 реакцию: **5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT**, **0,5 мкл полимеразы (TaqF)** и **10 мкл соответствующей ПЦР-смеси-1-FRT HCV** генотип (см. также табл. 3), причем ПЦР-

смесь-1-FRT HCV генотипы 1b/3a вносится в пробирку «1b/3a» и т.д. Полученные реакционные смеси перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

ВНИМАНИЕ! Реакционные смеси необходимо готовить с запасом на 1 образец (см. табл. 3).

5. Внести в пробирки, предназначенные для проведения амплификации, по **15 мкл** готовой реакционной смеси в соответствии с маркировкой, т.е. реакционная смесь «1b/3a» вносится в пробирки, промаркированные «№ образца_1b/3a» и т.д.
6. В подготовленные пробирки с раскапанными реакционными смесями в соответствии с маркировкой внести по **10 мкл кДНК-проб**, полученных в реакции обратной транскрипции, причем каждый образец, в том числе отрицательный контроль экстракции (ОК), необходимо внести в 3 пробирки, содержащие раскапанные реакционные смеси «1b/3a», «1a/2» и «ВКО/4».
7. Поставить **контрольные реакции**:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирки с раскапанными реакционными смесями «1b/3a», «1a/2» и «ВКО/4» по **10 мкл ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+_{1b/3a})** – в пробирку с реакционной смесью «1b/3a» внести **10 мкл ПКО кДНК HCV генотипы 1b/3a**;
 - в) **положительный контроль ПЦР (К+_{1a/2})** – в пробирку с реакционной смесью «1a/2» внести **10 мкл ПКО кДНК HCV генотипы 1a/2**;
 - г) **положительный контроль ПЦР (К+_{ВКО/4})** – в пробирку с реакционной смесью «ВКО/4» внести **10 мкл ПКО кДНК HCV ВКО/генотип 4**.

**Схема приготовления реакционных смесей
для варианта FRT**

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,50
Число клинических образцов	Число исследуемых точек ⁸	ПЦР-смесь-1-FRT HCV генотип *	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT*	Полимераза (TaqF)*
4	7	80	40	4,0
5	8	90	45	4,5
6	9	100	50	5,0
7	10	110	55	5,5
8	11	120	60	6,0
9	12	130	65	6,5
10	13	140	70	7,0
11	14	150	75	7,5
12	15	160	80	8,0

* – Объемы вносимых реагентов приведены с запасом на 1 образец.

A2. Подготовка пробирок для амплификации при использовании комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-6

1. До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с учетом количества исследуемых и контрольных образцов (один контроль экстракции РНК, два контроля амплификации). Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора.

ВНИМАНИЕ! Каждый образец анализируется с использованием четырех реакционных смесей, поэтому для каждого образца необходимо приготовить 4 пробирки. При использовании пробирок объемом 0,2 мл для приборов роторного типа промаркировать пробирки «№ образца_1b/3a», «№ образца_1a/2», «№ образца_ВКО/4» и «№ образца_5a/6», соответственно. При использовании приборов планшетного типа или при использовании

⁸ Число клинических образцов + 1 контроль этапа экстракции РНК + 2 контроля ПЦР (N+3, N – количество клинических образцов).

- стрипованных пробирок для приборов роторного типа использовать для этих целей промаркированный штатив.
3. Отобрать четыре пробирки объемом 0,5 мл для приготовления реакционных смесей. Промаркировать пробирки «1b/3a», «1a/2», «ВКО/4» и «5a/6».
 4. В каждую из четырех пробирок, предназначенных для приготовления реакционных смесей, внести из расчета на 1 реакцию: **5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT**, **0,5 мкл полимеразы (TaqF)** и **10 мкл соответствующей ПЦР-смеси-1-FRT HCV** генотип (см. также табл. 4), причем ПЦР-смесь-1-FRT HCV генотипы 1b/3a вносится в пробирку «1b/3a» и т.д. Полученные реакционные смеси перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

Таблица 4

**Схема приготовления реакционных смесей
для варианта FRT**

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,50
Число клинических образцов	Число исследуемых точек ⁹	ПЦР-смесь-1-FRT HCV генотип __ *	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT*	Полимераза (TaqF)*
4	7	80	40	4,0
5	8	90	45	4,5
6	9	100	50	5,0
7	10	110	55	5,5
8	11	120	60	6,0
9	12	130	65	6,5
10	13	140	70	7,0
11	14	150	75	7,5
12	15	160	80	8,0

* – объемы вносимых реагентов приведены с запасом на 1 образец.

5. Внести в пробирки, предназначенные для проведения амплификации, по **15 мкл** готовой реакционной смеси в соответствии с маркировкой, т.е. реакционная смесь «1b/3a» вносится в пробирки, промаркированные «№ образца_1b/3a» и т.д. В случае использования для проведения реакции амплификации стрипованных пробирок, реакционные смеси

⁹ Число клинических образцов + 1 контроль этапа экстракции РНК + 2 контроля ПЦР (N+3, N – количество клинических образцов).

ВНОСИТЬ В СООТВЕТСТВИИ СО СХЕМОЙ ПРЕДСТАВЛЕННОЙ НА РИС.1.

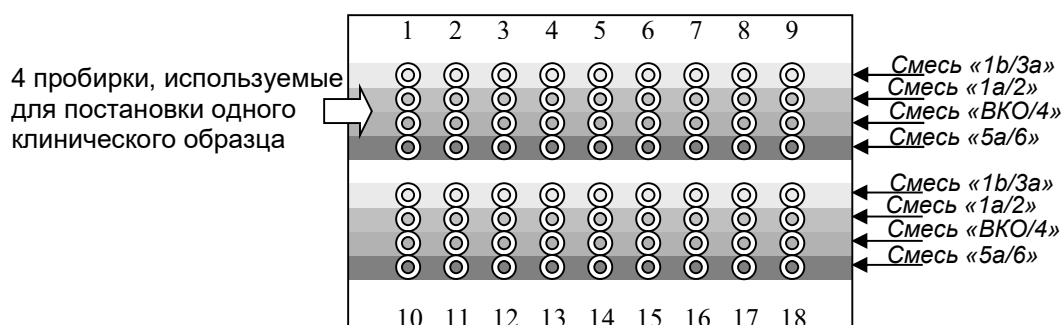


Рисунок 1. Схема внесения реакционных смесей и образцов при использовании для постановки ПЦР стрипованных пробирок.

6. В подготовленные пробирки с раскапанными реакционными смесями в соответствии с маркировкой внести по **10 мкл кДНК-проб**, полученных в реакции обратной транскрипции, причем каждый образец, в том числе отрицательный контроль экстракции (ОК), необходимо внести в 4 пробирки, содержащие раскапанные реакционные смеси «1b/3a», «1a/2», «ВКО/4» и «5a/6».
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К⁻)** – внести в пробирки с раскапанными реакционными смесями «1b/3a», «1a/2», «ВКО/4» и «5a/6» по **10 мкл ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К⁺_{1b/3a})** – в пробирку с реакционной смесью «1b/3a» внести **10 мкл ПКО кДНК HCV** генотипы 1b/3a;
 - в) **положительный контроль ПЦР (К⁺_{1a/2})** – в пробирку с реакционной смесью «1a/2» внести **10 мкл ПКО кДНК HCV** генотипы 1a/2;
 - г) **положительный контроль ПЦР (К⁺_{ВКО/4})** – в пробирку с реакционной смесью «ВКО/4» внести **10 мкл ПКО кДНК HCV ВКО/генотип 4**;
 - д) **положительный контроль ПЦР (К⁺_{5a/6})** – в пробирку с реакционной смесью «5a/6» внести **10 мкл ПКО кДНК HCV** генотипы 5a/6.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой

детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1» (см. табл. 5, 6).

Таблица 5

Программа «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа¹⁰

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. Темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/ Циклирование	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM, JOE ¹¹	
	72	15 с	–	

Таблица 6

**Программа «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа¹²
и прибора Smart Cycler II (Cepheid, США)**

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин (900 с ¹³)	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE ¹¹	
	72	15 с	–	

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

¹⁰ Например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).

¹¹ Название каналов детекции для соответствующего детектора см. в соответствующем разделе методических рекомендаций к набору реагентов.

¹² Например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США); Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США); «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

¹³ Для прибора Smart Cycler II (Cepheid, США).

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора FAM (или аналогичного) и каналу для флуорофора JOE (или аналогичного).

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов.

Результат амплификации по каналу считается *положительным*, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в реальном времени S-образный вид, однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, *отрицательным* в случае отсутствия кривой типичной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения C_t или C_p) и *сомнительным* во всех других случаях.

В таблице 7 указаны каналы, по которым детектируются генотипы *HCV* для каждой реакционной смеси.

Таблица 7

Реакционная смесь	«1b/3a»	«1a/2»	«ВКО/4»	«5a/6 ¹⁴ »
Канал для флуорофора	Выявляемые генотипы <i>HCV</i>			
FAM	1b	1a	ВКО	5a
JOE	3a	2	4	6

Учет результатов в контрольных образцах

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты прохождения контрольных образцов в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 8).

¹⁴ Входит в состав ПЦР-комплекта вариант FRT-g1-6.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Реакционная смесь	«1b/3a»		«1a/2»		«ВКО/4»		«5a/6» ¹⁵	
Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора							
	FAM	JOE	FAM	JOE	FAM	JOE	FAM	JOE
OK	Отсутствует значение <i>Ct</i>	Отсутствует значение <i>Ct</i>	Отсутствует значение <i>Ct</i>	Отсутствует значение <i>Ct</i>	Ниже граничного значения	Отсутствует значение <i>Ct</i>	Отсутствует значение <i>Ct</i>	Отсутствует значение <i>Ct</i>
K-	Отсутствует значение <i>Ct</i>	Отсутствует значение <i>Ct</i>	Отсутствует значение <i>Ct</i>	Отсутствует значение <i>Ct</i>	Отсутствует значение <i>Ct</i>	Отсутствует значение <i>Ct</i>	Отсутствует значение <i>Ct</i>	Отсутствует значение <i>Ct</i>
K+ _{1b/3a}	Ниже граничного значения	Ниже граничного значения	*	*	*	*	*	*
K+ _{1a/2}	*	*	Ниже граничного значения	Ниже граничного значения	*	*	*	*
K+ _{ВКО/4}	*	*	*	*	Ниже граничного значения	Ниже граничного значения	*	*
K+ _{5a/6}	*	*	*	*	*	*	Ниже граничного значения	Ниже граничного значения

* – На данной реакционной смеси не тестируется.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше к ПЦР-комплекту.

Учет результатов в исследуемых клинических образцах

1. Генотип *HCV*, присутствующий в данной пробе, устанавливается путём сопоставления результатов амплификации в трёх (для «ПЦР-комплекта» вариант FRT-g1-4) или четырех пробирках (для «ПЦР-комплекта» вариант FRT-g1-6) в соответствии с табл. 7, причем

- а) Если в таблице результатов для пробы определено значение *Ct*, соответствующее одному генотипу РНК *HCV*, то выдается результат «Генотип ...»;
- б) Если в таблице результатов для пробы определены два и более значений *Ct*, то выдается двойной, тройной и т. д. генотип. Исключение составляет следующий случай:
 - если для пробы определены значения *Ct* на

¹⁵ Входит в состав ПЦР-комплекта вариант FRT-g1-6.

реакционной смеси «ВКО/4» по каналу для флуорофора JOE (4 генотип *HCV*) и на реакционной смеси «1b/3a» по каналу для флуорофора FAM (1b генотип *HCV*), причем значение *Ct* по 4-му генотипу меньше значения *Ct* по первому генотипу на 10 и более циклов, то выдается результат **«Генотип 4»**.

2. Если в таблице результатов для пробы определено значение *Ct* только для ВКО (реакционная смесь «ВКО/4», канал для флуорофора FAM) и оно ниже граничного значения, указанного во вкладыше, то выдается результат **«Генотип *HCV* не определен»**. При этом если известно, что концентрация РНК *HCV* в этой пробе находится в пределах аналитической чувствительности набора реагентов, выдается результат **«Генотип *HCV* не определен по причине низкой вирусной нагрузки»**.
3. Если в таблице результатов для пробы отсутствуют значения *Ct* по всем генотипам, а значение *Ct* для ВКО (по каналу для флуорофора FAM на ПЦР-смеси-1-FRT *HCV* ВКО/генотип 4) не определено или превышает граничное (указанное во вкладыше), то требуется повторить ПЦР-исследование данной пробы, начиная с этапа экстракции РНК.

ВНИМАНИЕ!

1. Если значение *Ct* хотя бы в одной пробе с положительным контролем этапа ПЦР (К+_{1b/3a}, К+_{1a/2}, К+_{ВКО/4} или К+_{5a/6}) превышает указанное во вкладыше граничное значение или отсутствует, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (ОК) хотя бы на одной из реакционных смесей «1b/3a», «1a/2», «5a/6» по любому из используемых каналов и/или на реакционной смеси «ВКО/4» по каналу для флуорофора JOE детектируется положительный сигнал, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых на этой реакционной смеси был определен генотип *HCV*, начиная с этапа экстракции РНК.
3. Если для отрицательного контроля ПЦР (К-) на любой реакционной смеси по любому из каналов детектируется

Формат FRT Форма 3: **REF** R-V1-G(1-4)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0253-1-3;

Форма 6: **REF** R-V1-G(1-6)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0256-1-3 / **VER** 25.04.17 / стр. 28 из 36

положительный сигнал, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых на этой реакционной смеси был определен генотип *HCV*, начиная с этапа экстракции РНК.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 С не более 5 сут. При получении разупаковать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-сорб» и «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплекты реагентов «РЕВЕРТА-L» и «ПЦР-комплект», за исключением ОКО, ТЕ-буфера и ВКО STI-248-гес, хранить при температуре не выше минус 16 °С. ОКО, ТЕ-буфер и ВКО STI-248-гес из «ПЦР-комплекта» хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT HCV генотипы 1b/3a, ПЦР-смесь-1-FRT HCV генотипы 1a/2, ПЦР-смесь-1-FRT HCV ВКО/генотип 4 и ПЦР-смесь-1-FRT HCV генотипы 5a/6 хранить в защищенном от света месте.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® HCV-генотип-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)¹⁶.

¹⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Зав. Кафедрой клинической лабораторной
диагностики ФГБОУ ДПО РМАПО
Министерства Здравоохранения РФ
д.м.н., профессор

В.В. Долгов

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб»

Порядок работы

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный контроль экстракции). Промаркировать пробирки.
3. На дно каждой пробирки внести по **10 мкл ВКО STI-248-rec**.
4. В пробирки внести по **450 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.

Примечание – При большом объеме образцов для облегчения процедуры выделения допускается смешивание в отдельном флаконе **лизирующего раствора и ВКО STI-248-rec** (из расчета на один образец 450 мкл лизирующего раствора и 10 мкл ВКО STI-248-rec) с последующим разнесением по **450 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл.

5. В пробирки с **лизирующим раствором и ВКО** внести по **100 мкл пробы**, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**.
6. Плотные закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель со внутренней поверхности крышки пробирки.
7. Ресуспендировать сорбент, интенсивно перемешивая на вортексе. Добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **25 мкл ресуспендированного сорбента**.
8. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 10 мин при комнатной температуре, тщательно перемешивая каждые 2 мин.
9. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g (например, 10 тыс об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.
10. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный

отсасыватель.

11. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
12. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Отобрать раствор для отмывки 3 из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
13. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Полностью отобрать раствор для отмывки 4 из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
14. Высушить сорбент, поместив пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре 60 °C на 15 мин.
15. Ресуспендировать сорбент в **50 мкл РНК-буфера**. Прогреть в термостате при температуре 60 °C 2 мин, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 12 тыс g (например, 13400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.

ВНИМАНИЕ! Полученный препарат РНК хранению не подлежит, реакцию обратной транскрипции следует проводить сразу после получения РНК-пробы. Отбирать раствор РНК для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»

Порядок работы

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре до 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции).
3. На дно каждой пробирки внести по **10 мкл ВКО STI-248-гес**.
4. В пробирки внести по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.

Примечание – При большом объеме образцов для облегчения процедуры выделения допускается смешивание в отдельном флаконе **раствора для лизиса и ВКО STI-248-гес** (из расчета на один образец 300 мкл раствора для лизиса и 10 мкл ВКО STI-248-гес) с последующим разнесением по **300 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл.

5. В пробирки с **раствором для лизиса и ВКО** внести по **100 мкл пробы**, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**.
6. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
7. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, тщательно перемешать на вортексе.
8. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 12 тыс g (например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 5 мин.
9. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
10. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.

11. Центрифугировать при **12 тыс g** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
12. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
13. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
14. Центрифугировать при **12 тыс g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
15. Осторожно, не захватывая осадок, тщательно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
16. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
17. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
18. Центрифугировать пробирки при **12 тыс g** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Полученный препарат РНК хранению не подлежит, реакцию обратной транскрипции следует проводить сразу после получения РНК-пробы.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF

Номер в каталоге



Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации

LOT

Код партии



Максимальное число тестов

IVD

Изделие для in vitro диагностики



Использовать до

VER

Дата изменения



Обратитесь к руководству по эксплуатации



Ограничение температуры



Не допускать попадания солнечного света



Верхнее ограничение температуры



Дата изготовления



Производитель