

УТВЕРЖДАЮ

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

В.В. Малеев

« 25 » 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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 3 и 6 предназначены для проведения ПЦР-амплификации кДНК с гибридизационно-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-комплектom»:

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 <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
ОТ-ПЦР-смесь-2-FER/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	3 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	3 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
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 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
ПЦР-смесь-1-FRT HCV 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 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
ПКО кДНК HCV 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 (OK)). 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

ФОРМАТ FRT

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.

А2. 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.

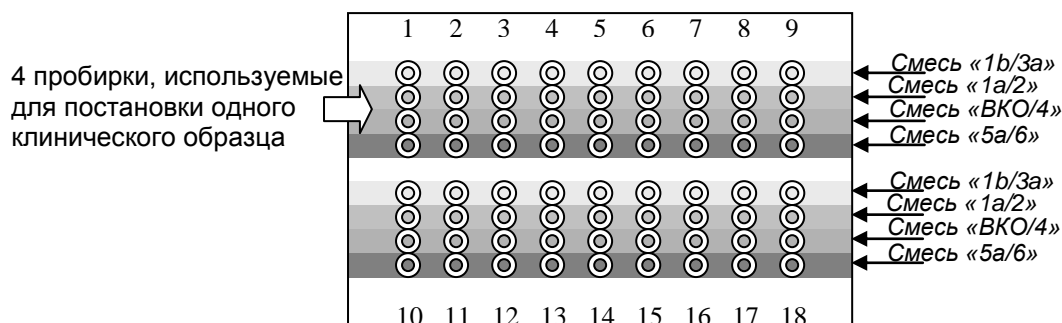


Рисунок 1. Схема внесения реакционных смесей и образцов при использовании для постановки ПЦР стрипованных пробирок.

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 (K⁻)** – 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 (K⁺_{1b/3a})** – в пробирку с реакционной смесью «1b/3a» внести **10 мкл ПКО кДНК HCV** генотипы 1b/3a;
 - в) **положительный контроль ПЦР (K⁺_{1a/2})** – в пробирку с реакционной смесью «1a/2» внести **10 мкл ПКО кДНК HCV** генотипы 1a/2;
 - г) **положительный контроль ПЦР (K⁺_{ВКО/4})** – в пробирку с реакционной смесью «ВКО/4» внести **10 мкл ПКО кДНК HCV ВКО/генотип 4**;
 - д) **положительный контроль ПЦР (K⁺_{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 поводят 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 Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Ниже граничного значения	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct
K-	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct	Отсутствует значение Ct
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 ($K+_{1b/3a}$, $K+_{1a/2}$, $K+_{ВКО/4}$ или $K+_{5a/6}$) 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 (OK) 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 ($K-$) 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-рес, хранить при температуре не выше минус 16 °С. ОКО, ТЕ-буфер и ВКО STI-248-рес 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-гес**.
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-гес** (из расчета на один образец 450 мкл лизирующего раствора и 10 мкл ВКО STI-248-гес) 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. Плотно 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 переверачивать 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, переверачивая 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 переверачивать 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

	Номер в каталоге		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
	Код партии		Максимальное число тестов
	Изделие для in vitro диагностики		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Ограничение температуры		Не допускать попадания солнечного света
	Верхнее ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		