УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 6.10.09г. № 7934-Пр/09

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека»
_____ В.И. Покровский
«16» июня 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 3)
вируса гепатита С (*HCV*) в клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *HCV*-1/2/3-FL»

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ. 3
СОСТАВ. 4
НАЗНАЧЕНИЕ. 6
ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ ПРОБ. 8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ. 8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА. 9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА. 12
Вариант FEP 16
Вариант FRT 20
АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ. 22
ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ. 25
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ. 26
Приложение 1 27
СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ВАРИАНТА FEP. 27
Приложение 2. 28
СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ВАРИАНТА FRT. 28

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Набор реагентов выпускается в 2 вариантах.

Вариант FEP.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP.

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP.

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формой **3** гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, или в случае выделения РНК при помощи автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™» («bioMérieux», Франция) совместно с комплектом реагентов «ЕМ-плюс» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Вариант FRT.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

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

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

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

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формой **3** гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора или в случае выделения РНК при помощи автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™» («bioMérieux», Франция) с использованием реагентов «NucliSENS® easyMAG™» («bioMérieux», Франция) совместно с комплектом реагентов «ЕМ-плюс» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СОСТАВ.

Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 (ТУ 9398-004-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость[1]	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость1	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 из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 (ТУ 9398-071-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
Раствор для лизиса	Прозрачная бесцветная жидкость1	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	22,5	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 из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК, совмещенной с ПЦР-амплификацией и дифференциации кДНК генотипов (1, 2, 3) вируса гепатита С (*HCV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» **включает**:

[1] 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HCV*-1/2/3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ПКО кДНК *HCV*-123	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.
Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО-1-*HCV*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК, совмещенной с ПЦР-амплификацией и дифференциации кДНК генотипов (1, 2, 3) вируса гепатита С (*HCV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HCV*-1/2/3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ПКО кДНК *HCV*-123	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО-1-*HCV*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов **«АмплиСенс® *HCV*-1/2/3-FL»** предназначен для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 3) вируса гепатита С (*HCV*) в *HCV*-положительном клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Вариант FEP. Формы комплектации 1 и 2 предназначены для полного анализа, включая этап выделения РНК/ДНК, проведение реакции обратной транскрипции РНК, ПЦР-амплификации и дифференциации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Форма комплектации 3 предназначена для проведения реакции обратной транскрипции РНК, ПЦР-амплификации и дифференциации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора или автоматическую станцию «NucliSENS® easyMAG™» (производства «bioMérieux», Франция) совместно с комплектом реагентов «ЕМ-плюс» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора для выделения РНК из клинического материала.

Вариант FRT. Формы комплектации 1 и 2 предназначены для полного анализа, включая этап выделения РНК/ДНК, проведение реакции обратной транскрипции РНК, ПЦР-амплификации и дифференциации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Форма комплектации 3 предназначена для проведения реакции обратной транскрипции РНК, ПЦР-амплификации и дифференциации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» производства ФГУН ЦНИИЭ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Роспотребнадзора или автоматическую станцию «NucliSENS® easyMAG™» (производства «bioMérieux», Франция) совместно с комплектом реагентов «ЕМ-плюс» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора для выделения РНК из клинического материала.

Принцип тестирования: выделение тотальной РНК из плазмы крови; проведение реакции обратной транскрипции РНК, совмещенной с реакцией амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР «по конечной точке» (вариант FEP) или в режиме «реального времени» (вариант FRT). По каналу FAM/Green детектируется продукт амплификации кДНК *HCV* генотипа 1. По каналу JOE/HEX/Yellow детектируется продукт амплификации кДНК *HCV* генотипа 2. По каналу ROX/TexasRed/Orange детектируется продукт амплификации кДНК *HCV* генотипа 3. Для варианта FRT по каналу Cy5/Red детектируется продукт амплификации фрагмента кДНК *HCV*, общего для всех генотипов *HCV* – контроль присутствия в анализируемом образце кДНК *HCV*, который в данном тесте служит внутренним контрольным образцом. Положительный контрольный образец ПКО-1-*HCV*, является общим для наборов реагентов «АмплиСенс® *HCV*-1/2/3-FL», «АмплиСенс® *HCV*-FL» и «АмплиСенс® *HCV*-FRT» («АмплиСенс® *HCV*-Монитор-FRT», «АмплиСенс® *HCV*-FEP») и детектируется по каналам FAM/Green (генотип 1) и каналу Cy5/Red (общий для всех генотипов). Контрольный образец амплификации ПКО кДНК *HCV*-123 содержит участок кДНК *HCV* общий для всех генотипов и детектируется по каналам FAM/Green (генотип 1), JOE/HEX/Yellow (генотип 2), ROX/Texas Red/Orange (генотип 3), для варианта FRT детектируется также по каналу Cy5/Red (генотипы 1, 2 и 3). С целью оптимизации процедуры лабораторного исследования допускается проведение единой процедуры выделения РНК для выявления, количественного определения и генотипирования РНК *HCV*. Пробы РНК, выделенные при помощи реагентов входящих в состав наборов «АмплиСенс® *HCV*-FL», «АмплиСенс® *HCV*-FRT», «АмплиСенс® *HCV*-Монитор-FRT» пригодны для проведения исследования данным набором.

Чувствительность наборов реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Вариант FEP. Аналитическая чувствительность набора реагентов при выделении наборами «РИБО-сорб», «РИБО-преп» и при помощи автоматической стации «NucliSENS easyMAG» с использованием реагентов «NucliSENS® easyMAG™» («bioMérieux», Франция) совместно с комплектом реагентов «ЕМ-плюс» из объема плазмы 100 мкл составляет 2000 МЕ/мл, при выделении при помощи автоматической стации «NucliSENS easyMAG» совместно с комплектом реагентов «ЕМ-плюс» из объема плазмы 1000 мкл аналитическая чувствительность составляет 200 МЕ/мл.
Вариант FRT. Аналитическая чувствительность набора реагентов при выделении наборами «РИБО-сорб», «РИБО-преп» и при помощи автоматической стации «NucliSENS easyMAG» с использованием реагентов «NucliSENS® easyMAG™» («bioMérieux», Франция) совместно с комплектом реагентов «ЕМ-плюс» из объема плазмы 100 мкл составляет 500 МЕ/мл, при выделении при помощи автоматической стации «NucliSENS easyMAG» совместно с комплектом реагентов «ЕМ-плюс» из объема плазмы 1000 мкл аналитическая чувствительность составляет 50 МЕ/мл.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ ПРОБ.

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 анализа используется плазма периферической крови. Взятие крови проводится утром натощак в пробирку с 3 % раствором ЭДТА из расчета 1:20. 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. Хранить плазму можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

1. **Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.**
2. Анализ проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».
3. Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным барьером.
4. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.
5. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
6. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо облучать ультрафиолетовым светом в течение 30 мин.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.
(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

ЗОНА 1.

Для выделения РНК из проб требуются:

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Axygen», США).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).
6. Штативы для наконечников (например, «Axygen», США) и микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
7. Холодильник от 2 до 8 °С.
8. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
9. Емкость с дезинфицирующим раствором.

<u>При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп»:</u>

1. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
2. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс g (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, «Axygen», США).
5. Одноразовый флакон на 10-20 мл (например, «Zinsser», Германия).

<u>При использовании автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™»:</u>

1. Автоматическая станция для выделения РНК/ДНК «NucliSENS® easyMAG™» (поставщик «ИнтерЛабСервис», Россия).
2. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™» (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) («bioMérieux», Франция).
3. Дополнительный комплект реагентов «ЕМ-плюс» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЗОНА 2.

Для проведения реакции обратной транскрипции, ПЦР-амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации требуются:

Вариант FEP: амплификатор, адаптированный для ПЦР-пробирок 0,5 мл, например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) или амплификатор, адаптированный для ПЦР-пробирок 0,2 мл, например, «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research», Австралия), «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems», США) «MAXYGENE» («Axygen», США) или эквивалентные. Флуоресцентный ПЦР-детектор, например, «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия), «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия) или эквивалентный.

Вариант FRT: амплификатор роторного типа, например, «Rotor-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) или амплификатор планшетного типа, например, «iQ5» («BioRad», США), «Mx3000P» («Stratagene», США) или эквивалентные.

1. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
2. Для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»). Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например, «Axygen», США) для постановки в ротор на 36 пробирок.
   Для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «iQ5», «Mx3000P»). Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Axygen», США).
   Для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,2 мл («Gradient Palm Cycler», «GeneAmp PCR System 2700», «MAXYGENE» и др.). Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные) (например, «Axygen», США).
   Для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,5 мл («Терцик» и др.). Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,5 мл (плоская крышка,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

нестрипованные) (например, «Axygen», США).
3. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
4. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
5. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Axygen», США).
6. Штативы для наконечников (например, «Axygen», США) и микропробирок на 0,5 (0,2) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
7. Холодильник от 2 до 8 °С.
8. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
9. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.

<u>ЭТАП 1.</u> ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ ПРОБ.

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала).

Объем исследуемого материала для выделения РНК – 0,1 мл.

ВНИМАНИЕ! Для работы с РНК (этап постановки ОТ-ПЦР) необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

А. При использовании 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 и положительный контроли выделения). Промаркировать пробирки.
3. В пробирки раскапать по **450 мкл лизирующего раствора**.
4. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя наконечники с аэрозольными барьерами. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить на центрифуге для сброса капель жидкости с крышки.
5. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контрольный образец (ПКО)**. Для этого в пробирку с

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-*HCV***, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.

6. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контрольный образец (ОКО)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Ресуспендировать сорбент, интенсивно перемешивая на вортексе. Добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **25 мкл ресуспендированного сорбента**.
8. Перемешать содержимое пробирок на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.
9. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 10 тыс g (например, для центрифуги Eppendorf MiniSpin – 10 тыс об/мин) 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 10 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 10 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 10 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 °С на 15 мин.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

15. Ресуспендировать сорбент в **50 мкл РНК-буфера**. Прогреть в термостате при температуре 60 °С 5 мин, перемешать на вортексе и процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (~12 тыс g) в течение 2 мин.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес, или не выше минус 68 °С в течение года.

Б. При использовании 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 выделения). Промаркировать пробирки.
3. В пробирки раскапать по **300 мкл раствора для лизиса**.
4. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя наконечники с аэрозольными барьерами. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить на центрифуге для сброса капель жидкости с крышки.
5. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контрольный образец (ПКО)**. Для этого в пробирку с раствором для лизиса добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-*HCV***, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
6. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контрольный образец (ОКО)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Содержимое пробирок прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
8. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **13 тыс g.**
10. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
11. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
12. Центрифугировать при **13 тыс g в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
14. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
15. Центрифугировать при **13 тыс g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
16. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
17. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
18. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
19. Центрифугировать пробирки при **13 тыс g в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарат необходимо хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес, или не выше минус 68 °С в течение года.

В. При использовании автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™».

При использовании автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™»,реагентов «NucliSENS® easyMAG™»

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

(«bioMérieux», Франция) и комплекта реагентов «ЕМ-плюс» совместно с набором реагентов возможно использование протоколов, позволяющих проводить выделение РНК из объемов образцов от 0,1 мл до 1 мл.

Процедура выделения проводится в соответствие с инструкцией к автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™». Допускается использование режимов лизиса на борту прибора («On-board») и вне прибора («Off-board»). Программируемый объем элюции – 55 мкл.

После окончания выделения РНК, извлечь пробирки из прибора и **не позднее 30 мин после окончания процедуры выделения РНК провести реакцию ОТ-ПЦР.**

Порядок работы также см. в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 3) вируса гепатита С (*HCV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *HCV*-1/2/3-FL» (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ, ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.

(проводится в ЗОНЕ 2 - помещении для проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации).

Общий объем реакции - 25 мкл, объем РНК-пробы - 10 мкл.

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

Вариант FEP.

Порядок работы.

А. Подготовка реакционной смеси для проведения ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. приложение 1).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 на 0,2 мл или на 0,5 мл с учетом количества исследуемых, контрольных образцов (два контроля выделения, один контроль амплификации) и пробирок «Фон». Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. **Для приготовления реакционной смеси в случае необходимости подготовки пробирок «Фон»** необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать из расчета на 1 реакцию**: 10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT-*HCV*-1/2/3, 5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT и 0,25 мкл RT-G-mix-2 (см. также приложение 1, пункт А).** Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
4. Добавить в две пробирки **«Фон»** по **15 мкл приготовленной смеси** (без полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMlv)) и по **10 мкл РНК-буфера**, перемешать пипетированием. Сверху раскапать по 1 капле **минерального масла для ПЦР**.

ВНИМАНИЕ! После проведения амплификации образцы **«Фон»** можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С и использовать многократно. Многократное использование пробирок **«Фон»** допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа ПЦР-пробирок.

5. В оставшуюся часть реакционной смеси добавить из расчета на 1 пробу **0,5 мкл полимеразы (TaqF)** и **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMlv) (см. также приложение 1, пункт А).** Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

   *Количество добавляемых в реакционную смесь ферментов полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMlv), указанное в таблице в **приложении 1, пункт А**, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок «Фон».*
6. **В случае повторного использования образцов «Фон»** необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать из расчета на 1 реакцию**: 10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT-**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

***HCV*-1/2/3, 5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT**, **0,25 мкл RT-G-mix-2, 0,5 мкл полимеразы (TaqF)** и **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMlv) (см. также приложение 1, пункт Б).** Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

7. Внести в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси. Сверху раскапать по 1 капле **минерального масла для ПЦР**.
8. В готовые пробирки внести по **10 мкл РНК-проб**, выделенных из клинических образцов.

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

9. Поставить **контрольные реакции этапов экстракции РНК и амплификации**:
   а) **положительный контрольный образец (ПКО)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-пробы**, выделенной из образца ПКО-1-*HCV*.
   б) **отрицательный контрольный образец (ОКО)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-пробы**, выделенной из образца ОКО.
   в) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *HCV*-123**.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

Б. Проведение амплификации.

1. Запустить на амплификаторе программу термоциклирования (см. табл. 1). Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и запустить выполнение программы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1

Программа амплификации

Для амплификаторов с активным регулированием[2]				Для амплификаторов с матричным регулированием[3]			
цикл	температура, °С	время	циклов	цикл	температура, °С	время	циклов
1	**50**	**30 мин**	**1**	**1**	**50**	**30 мин**	**1**
2	**95**	**15 мин**	**1**	**2**	**95**	**15 мин**	**1**
3	**95**	**2 с**	**45**	**3**	**95**	**10 с**	**45**
	60	**10 с**			**60**	**15 с**	
					72	**15 с**	
4	**10**	Хранение		**4**	**10**	Хранение	

2. По окончании выполнения программы амплификации приступить к детекции и учету результатов.

B. Детекция результатов с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора

Работа с флуоресцентными ПЦР-детекторами осуществляется согласно инструкции к соответствующему прибору.

Каналы детекции.

Таблица 2

Детекция осуществляется по трем каналам

Флуоресцентный канал	Тип	Расшифровка
FAM/Green	Специфика	«Генотип 1»
HEX/Yellow	Специфика	«Генотип 2»
ROX/Orange	Специфика	«Генотип 3»

Внутренний контроль отсутствует

Пороговые значения.

Таблица 3

Пороговые значения для различного оборудования

Прибор	Флуоресцентные каналы	Нижний порог	Верхний порог
«Ala-1/4»	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange	**2,0**	**2,4**
«Джин-4»	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange	**2,0**	**3,0**
Rotor Gene 6000 (FEP анализ)	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange	**2,5**	**3,5**

Учет результатов.

1. Значения менее нижнего порога принимаются

[2] Например, «Терцик» («ДНК-Технология»), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»), «MAXYGENE» («Axygen»), «GeneAmp PCR System 2400» («Perkin Elmer») и др.

[3] Например, «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems») «PTC-100» («MJ Research»), «T-personal» («Biometra») и др.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

отрицательными, более верхнего порога – положительными, между порогами – сомнительными.

2. Положительный результат по каналу FAM/Green свидетельствует о наличии в пробе РНК *HCV* генотипа 1, HEX/Yellow – РНК *HCV* генотипа 2, ROX/Orange – РНК *HCV* генотипа 3.
3. При получении сомнительного результата детекции, требуется повторное проведение анализа данной пробы.
4. Результат считается достоверным только в случае прохождения положительного и отрицательного контролей.

Таблица 4

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Результат автоматической интерпретации
«ОКО»	Выделение РНК, ПЦР	FAM/Green *(HCV* 1) – отрицательный HEX/Yellow (*HCV* 2) – отрицательный ROX/Orange *(HCV* 3) – отрицательный
«ПКО»	Выделение РНК	FAM/Green *(HCV* 1) – положительный HEX/Yellow (*HCV* 2) – отрицательный ROX/Orange *(HCV* 3) – отрицательный
«К+»	ПЦР	FAM/Green *(HCV* 1) – положительный HEX/Yellow (*HCV* 2) – положительный ROX/Orange *(HCV* 3) – положительный

Результаты не подлежат учету в случае:

1. Отсутствия положительного сигнала в пробе с положительными контролями (ПКО и К+) – может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации или о других ошибках, допущенных на этапах выделения РНК и постановки ПЦР. Необходимо провести анализ повторно, начиная с этапа ОТ-ПЦР.
2. Наличия в отрицательном контроле (ОКО) положительного сигнала **– указывает на наличие контаминации** реактивов или проб на этапе выделения РНК или на этапе ПЦР. Необходимо принять меры по обнаружению и ликвидации источника контаминации, повторить анализ всех проб, начиная с этапа выделения РНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Вариант FRT.

Порядок работы.

А. Подготовка реакционной смеси для проведения ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице (см. приложение 2)**.

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, контрольных образцов (два контроля выделения, один контроль амплификации). Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора
3. **Для приготовления реакционной смеси** необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать из расчета на 1 реакцию: **10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT-*HCV*-1/2/3, 5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT**, **0,25 мкл RT-G-mix-2, 0,5 мкл полимеразы (TaqF)** и **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMlv).** Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
4. Раскапать в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.
5. В готовые пробирки внести по **10 мкл** РНК-проб, выделенных из клинических образцов. **ВНИМАНИЕ! При добавлении РНК-проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб» необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь**.
6. Поставить **контрольные реакции этапов экстракции РНК и амплификации**:
   а) **положительный контрольный образец (ПКО)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-пробы**, выделенной из образца ПКО-1-*HCV*.
   б) **отрицательный контрольный образец (ОКО)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-пробы**, выделенной из образца ОКО.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

в) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *HCV*-123**.

Б. Проведение амплификации.

1. Установить пробирки в реакционный модуль.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.

Программа амплификации «АмплиСенс-3» для приборов роторного типа[4]

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	–	

Программа амплификации «АмплиСенс-3» для приборов планшетного типа[5]

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, HEX/JOE, ROX/Texas Red, Cy5	
	72	15 с	–	

3. По окончании выполнения программы приступить к учету результатов.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам – анализируются с помощью

[4] Например, RotorGene 3000 и RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия)
[5] Например, iQiCycler, iQ5 (BioRad, США), Mx3000P (Stratagene, США)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени». По каналу FAM/Green детектируется продукт амплификации кДНК *HCV* генотипа 1. По каналу JOE/HEX/Yellow детектируется продукт амплификации кДНК *HCV* генотипа 2. По каналу ROX/Texas Red/Orange детектируется продукт амплификации кДНК *HCV* генотипа 3. По каналу Cy5/Red детектируется продукт амплификации фрагмента кДНК *HCV*, общего для всех генотипов *HCV* – контроль присутствия в анализируемом образце кДНК *HCV*. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «*Ct*» 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 флуореценции, и значение порогового цикла (*Ct* или *Cp*) для данного канала менее указанного во вкладыше к набору реагентов, *отрицательным* в случае отсутствия кривой типичной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения *Ct* или *Cp*, *сомнительным* во всех других случаях.

(*см. также инструкции к соответствующим приборам для ПЦР в реальном времени и Методические Рекомендации по применению набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 3) вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HCV-1/2/3-FL» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора)*.

<u>Учет результатов в контрольных точках.</u>

1. Результаты всего эксперимента считаются достоверными только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов «ОКО» и «ПКО» (см. табл. 5).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 5

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап анализа	Результат амплификации по каналу			
		Green/FAM	Yellow/JOE	ROX/Orange	Cy5/Red
ОКО	Выделение РНК, ПЦР	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный
ПКО	Выделение РНК, ПЦР	положительный	отрицательный	отрицательный	положительный
«К+»	ПЦР	положительный	положительный	положительный	положительный

Учет результатов в исследуемых клинических образцах.

1. **Образец содержит РНК *HCV* генотип 1**, если получен положительный результат амплификации на канале Green/FAM.
2. **Образец содержит РНК *HCV* генотип 2**, если получен положительный результат амплификации на канале Yellow/JOE/HEX.
3. **Образец содержит РНК *HCV* генотип 3**, если получен положительный результат амплификации на канале ROX/Orange.
4. **Образец содержит РНК *HCV* другого (редкого) генотипа**, если на каналах FAM/Green, JOE/HEX/Yellow и ROX/Orange отсутствует значение Ct, при этом получен положительный результат амплификации значение Ct на канале Cy5/Red.
5. **Образец считается сомнительным** в случае получения сомнительного результата по любому из каналов. Рекомендуется повторное исследование образца.
6. **Образец считается нетипируемым по причине низкой вирусной нагрузки** в случае, если ходе двукратного исследования образца, начиная с этапа выделения, получен отрицательный результат амплификации на всех четырех каналах (Green/FAM, Yellow/JOE/HEX, ROX/Orange, Red/Cy5) или сочетание сомнительных и отрицательных результатов по четырем каналам.

Возможные ошибки.

1. Отсутствие положительного сигнала флуоресцентной детекции по каналам FAM/Green и CY5/Red в пробе с положительным контрольным образцом (ПКО) или отсутствие положительного сигнала флуоресцентной

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

детекции по всем 4 каналам детекции в пробе с положительным контрольным образцом этапа ПЦР (K+) может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации или о других ошибках, допущенных на этапах выделения РНК/ДНК или постановки ПЦР. В этом случае необходимо провести ПЦР еще раз.

2. Появление любого значения *Ct* в таблице результатов по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange и CY5/Red для отрицательного контроля «ОКО» свидетельствует о контаминации реактивов или образцов. В этом случае требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ проб, начиная с этапа выделения.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

1. Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить на каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

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

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп» и «ПЦР-комплект» (кроме RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *HCV*-1/2/3, ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT, полимеразы (TaqF), ТМ-ревертазы (MMlv)) хранить при температуре от 2 до 8 °С. RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HCV*-1/2/3, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF), ТМ-ревертазу (MMlv) (из комплекта реагентов «ПЦР-комплект») хранить при температуре не выше минус 16 °С.

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

Рекламации на качество набора реагентов **«АмплиСенс® *HCV*-1/2/3-FL»** направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (499) 241-39-22, факс (499) 241-92-38), в адрес предприятия-изготовителя ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23) и в адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Директор ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора — В.И.Покровский

Руководитель Государственных испытаний — Р.А. Волкова

Зав. лабораторией биохимии и биотехнологии

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приложение 1

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ВАРИАНТА FEP.

А. ЕСЛИ ПРОБИРКИ «ФОН» ГОТОВЯТСЯ

		Этап 1. Смесь из трех компонентов. Объем реактивов на указанное кол-во образцов с учетом контрольных точек и 2 образцов «Фон» (без TaqF и MMlv, учтен запас на один образец (мкл)			**Этап 2. Внесение ферментов. Кол-во добавляемых ферментов на указанное кол-во образцов после отбора смеси на 2 образца «Фон» (мкл)**	
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		**10.00**	**5.00**	**0.25**	**0.50**	**0.25**
Число клинических образцов	**Число исследуемых точек[6]**	**ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HCV*-1/2/3**	**ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT**	**RT-G-mix-2**	**Полимераза (TaqF)**	**ТМ-Ревертаза (MMlv)**
6	**9**	**120**	**60**	**3.0**	**5.0**	**2.5**
10[7]	**13**	**160**	**80**	**4.0**	**7.0**	**3.5**
22[8]	**25**	**280**	**140**	**7.0**	**13.0**	**6.5**
34	**37**	**400**	**200**	**10.0**	**19.0**	**9.5**
46	**49**	**520**	**260**	**13.0**	**25.0**	**12.5**

ВНИМАНИЕ: В данной таблице количество добавляемых полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMlv) рассчитано за вычетом двух пробирок «Фон».

Б. ЕСЛИ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ РАНЕЕ ПРИГОТОВЛЕННЫЕ ПРОБИРКИ «ФОН»[9]

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		**10.00**	**5.00**	**0.25**	**0.50**	**0.25**
Число клинических образцов	**Число исследуемых точек**	**ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HCV*-1/2/3**	**ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT**	**RT-G-mix-2**	**Полимераза (TaqF)**	**ТМ-Ревертаза (MMlv)**
6	**9**	**100**	**50**	**2.5**	**5.0**	**2.5**
10	**13**	**140**	**70**	**3.5**	**7.0**	**3.5**
22	**25**	**260**	**130**	**6.5**	**13.0**	**6.5**
34	**37**	**380**	**190**	**9.5**	**19.0**	**9.5**
46	**49**	**500**	**250**	**12.5**	**25.0**	**12.5**

[6] Число клинических образцов + 2 контроля этапа выделения РНК + 1 контроль ОТ-ПЦР, (N+3, N - количество клинических образцов)

[7] Панель из 12 пробирок на выделение

[8] Панель из 24 пробирок на выделение

[9] Допускается повторное исследование пробирок «ФОН» при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа ПЦР-пробирок

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приложение 2.

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ВАРИАНТА FRT.

		Объем реактивов на указанное количество исследуемых точек с запасом на один образец				
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		**10.00**	**5.00**	**0.25**	**0.50**	**0.25**
Число клинических образцов	**Число исследуемых точек[10]**	**ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HCV*-1/2/3**	**ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT**	**RT-G-mix-2**	**Полимераза (TaqF)**	**ТМ-Ревертаза (MMlv)**
4	**7**	**80**	**40**	**2.0**	**4.0**	**2.0**
6[11]	**9**	**100**	**50**	**2.5**	**5.0**	**2.5**
8	**11**	**120**	**60**	**3.0**	**6.0**	**3.0**
10[12]	**13**	**140**	**70**	**3.5**	**7.0**	**3.5**
12	**15**	**160**	**80**	**4.0**	**8.0**	**4.0**
14[13]	**17**	**180**	**90**	**4.5**	**9.0**	**4.5**
16	**19**	**200**	**100**	**5.0**	**10.0**	**5.0**
18	**21**	**220**	**110**	**5.5**	**11.0**	**5.5**
20	**23**	**240**	**120**	**6.0**	**12.0**	**6.0**
22[14]	**25**	**260**	**130**	**6.5**	**13.0**	**6.5**
34	**37**	**380**	**190**	**9.5**	**19.0**	**9.5**
46	**49**	**500**	**250**	**12.5**	**25.0**	**12.5**

[10] Число клинических образцов + 2 контроля этапа выделения РНК + 1 контроль ОТ-ПЦР, (N+3, N - количество клинических образцов)
[11] Выделение одного стрипа на приборе «NucliSENS® easyMAG™» (8 пробирок)
[12] Панель из 12 пробирок на выделение
[13] Выделение двух стрипов на приборе «NucliSENS® easyMAG™» (16 пробирок)
[14] Панель из 24 пробирок на выделение, выделение трех стрипов на приборе «NucliSENS® easyMAG™»

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru