ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

Инструкция по применению
ОТ-ГЕПАТОГЕН-С

Организация-производитель

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «НПО ДНК-Технология»

В.Ю.Дмитровский

«____» апреля 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) методом обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции

ОТ-ГЕПАТОГЕН-С

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО«НПО ДНК-Технология»
ДМИТРОВСКИЙ В.Ю.
ПОДПИСЬ

2022 г.

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С предназначен для выявления РНК вируса гепатита С (Hepatitis C virus) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

1.2. Набор может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике для диагностики вируса гепатита С *in vitro*.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ.

Набор реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

Внутренний контрольный образец, представляющий собой стабилизированный фрагмент РНК, добавляется в исследуемый образец на стадии выделения нуклеиновых кислот и предназначен для оценки качества всех этапов исследования.

В наборах в формате «Flash» и «Real-time» в реакционную смесь введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфичного продукта ДНК-зонд

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

разрушается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами.

ДНК-зонды, использующиеся для детекции продуктов амплификации искомой нуклеиновой кислоты (НК) и внутреннего контрольного образца (ВК), мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет раздельно регистрировать результаты амплификации кДНК вируса гепатита С и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР можно использовать детектирующие амплификаторы, специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы) или метод электрофореза в агарозном геле.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в амплификационную смесь происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

2.2 СОСТАВ НАБОРА.

В зависимости от способа детекции результатов амплификации набор выпускается в трёх форматах:

Формат «Форез» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Формат «Flash» (по конечной точке) предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора.

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

Формат «Real-time» (в режиме реального времени) предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью детектирующих амплификаторов.

Набор состоит из трех комплектов:

а) комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот («Проба-НК»), включает:

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

Комплект является универсальным для всех форматов. Включается в набор по желанию заказчика.

Примечание: При хранении допускается выпадение небольшого количества осадка в лизирующем растворе, который растворяется прогреванием лизирующего раствора при 65 °С.

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

б) комплект реагентов для обратной транскрипции включает:

- буферный раствор для обратной транскрипции «ОТ-буфер», 200 мкл 1 пробирка;
- смесь праймеров (ОТ-HAV, ОТ-HCV, ОТ-HGV, ОТ-HDV, ОТ-HIV) и дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) для обратной транскрипции «праймеры ОТ-МIX и дНТФ», 100 мкл 1 пробирка;
- обратную транскриптазу, 50 мкл 1 пробирка;

Комплект является универсальным для всех форматов.

в) комплект реагентов для ПЦР-амплификации включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином, по 20 мкл 100 пробирок или 96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок;
- ПЦР-буфер, по 500 мкл 2 пробирки;
- минеральное масло, по 1,0 мл 2 пробирки;
- полимеразу ТехноТаq, 50 мкл 1 пробирка;
- положительный контрольный образец (К+), 150 мкл 1 пробирка.

В состав смеси для амплификации входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры. В наборах форматов «Flash» и «Real-time» в состав смеси для амплификации входят флуоресцентные ДНК-зонды.

г) комплект реагентов для детекции ДНК методом электрофореза включает:

- смесь для электрофореза – 1 пакет (9,55 г);
- агарозный гель – 5 пластин.

Комплект используется в наборе формата «Форез».

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

Для удобства потребителей в комплект реагентов для ПЦР-амплификации дополнительно включены 4 запасные пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином.

2.3 Время проведения анализа - 5 ч.

2.4 Набор рассчитан на проведение 100 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНАЛИЗА

В образцах биологического материала человека, содержащих РНК вируса гепатита С, ПЦР-детектор (формат «Flash») или детектирующий амплификатор (формат «Real-time») должны регистрировать положительный результат. При использовании метода гель-электрофореза (формат «Форез»), должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома вируса гепатита С размером 253 п.н. (пар нуклеотидов).

В образцах биологического материала, не содержащих РНК вируса гепатита С, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должны регистрировать отрицательный результат. При использовании метода гель-электрофореза полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома вируса гепатита С

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

размером 253 п.н. отсутствует, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 480 п.н., должна быть отчетливо видна.

3.2 ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АНАЛИЗА: 200 копий на 1 мл плазмы.

3.3 ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ: 99,8%

3.4 ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ: 100 %.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Общие требования безопасности к наборам реагентов для in vitro диагностики в соответствии с ГОСТ ISO 14971-2011. При работе с набором реагентов следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 и МУ 1.3. 2569-09.

4.2 Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ 31508-2012, Приказ Минздрава России от 06.06.2012 № 4н).

4.3 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.4 Работать с набором в одноразовых перчатках без талька.

4.5 При работе с набором следует использовать только новые наконечники и пробирки.

4.6 Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов крови.

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

4.7 Выделение НК следует проводить в ламинарных шкафах с включенным ламинарным потоком. Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.

4.8 Для предотвращения контаминации, этапы выделения РНК, обратной транскрипции, ПЦР и детекции следует проводить в раздельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

4.9 Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

4.10 Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.11 Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

4.12 Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.

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

4.13 Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3. 2569-09.

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

- амплификатор детектирующий: ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96, iCycler iQ, iCycler iQ5, Rotor-Gene Q (для формата «Real-time»);
- термостат программируемый для ПЦР-анализа «Терцик» или аналогичный (для форматов «Форез» и «Flash»);
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1-«ДНК-Техн.» или аналогичный;
- микроцентрифуга-вортекс со скоростью вращения 1000-3000 об/мин;
- насос с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объемом 1,5 мл; 0,5-0,6 мл;
- пипетки автоматические одноканальные с переменным объёмом: 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для автоматических пипеток с маркировкой “RNAase-free, DNAase-free” объемом 1-20 мкл; 1-50 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские;

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

- контейнер с дезинфицирующим раствором.

При работе с набором в формате «Flash» для детекции результатов требуется:

- детектор полимеразной цепной реакции флуоресцентный «ДЖИН-4» или аналогичный.

При детекции методом электрофореза требуются:

- устройство для электрофореза нуклеиновых кислот в агарозных и акриламидных гелях УЭФ-01-«ДНК-Тех.» или аналогичное;
- камера для электрофореза;
- трансиллюминатор ультрафиолетовый (флуоскоп);
- колба мерная вместимостью 1 л;
- дистиллированная вода;
- стальная проволока диаметром 1 мм.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 ВЗЯТИЕ ОБРАЗЦОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Взятие крови проводится в пластиковые пробирки объемом 2,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2-3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

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

6.2 ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

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

6.3 ПОЛУЧЕНИЕ ПЛАЗМЫ

6.3.1 Пробирки с кровью центрифугировать при 3000 об/мин в течение 20 мин.

6.3.2 После центрифугирования отобрать автоматической пипеткой верхнюю фракцию и перенести в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

Полученная плазма готова для выделения НК.

При необходимости хранить полученную плазму при температуре минус 20 °С не более 3 месяцев.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Примечание. Перед началом работы достать из холодильника комплект реагентов для выделения НК и проконтролировать отсутствие осадка в

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

лизирующем растворе. В случае выпадения осадка, лизирующий раствор прогреть при 65 °С до полного растворения осадка.

ВНИМАНИЕ! На данном этапе используйте только наконечники с маркировкой "RNAase-free, DNAase-free".

7.1.1 Промаркировать необходимое количество новых пластиковых пробирок объемом 1,5 мл с учетом пробирок для отрицательного контрольного образца (К-).

7.1.2 Внести по 10 мкл внутреннего контрольного образца (РНК-ВК) в каждую пластиковую пробирку.

7.1.3 Внести по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.

7.1.4 Добавить в пробирки для исследуемых образцов 100 мкл исследуемого образца (плазмы крови). В пробирку, промаркированную «К-», добавить 100 мкл отрицательного контрольного образца.

7.1.5 Плотно закрыть крышки пробирок, перемешать на вортексе в течение 3-5 с и осадить капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с.

7.1.6 Термостатировать исследуемые образцы и «К-» при 65 °С в течение 15 мин, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с.

7.1.7 Добавить 400 мкл реагента для преципитации, перемешать на вортексе в течение 3-5 с.

7.1.8 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин.

7.1.9 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

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

7.1.10 Добавить к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.

7.1.11 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.

7.1.12 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

7.1.13 Добавить к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.

7.1.14 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.

7.1.15 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

7.1.16 Открыть крышки пробирок и высушить осадок при 65 °С в течение 5 мин.

7.1.17 Добавить к осадку 16,5 мкл буфера для растворения и прогреть пробирки при 65 °С в течение 10 мин, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с.

Полученный препарат РНК необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции, так как препарат РНК не подлежит хранению.

7.2 ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

7.2.1 Разморозить содержимое пробирок ОТ-буфер и «праймеры ОТ-МИХ и дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при 18-25 °С, затем тщательно перемешать на вортексе и осадить капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с.

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

7.2.2 В отдельной пластиковой пробирке приготовить ОТ-смесь путем смешивания ОТ-буфера, «праймеров ОТ-МIX и дНТФ» и обратной транскриптазы:

- 2,0х(N+1) мкл ОТ-буфера,
- 1,0х(N+1) мкл «праймеры ОТ-МIX и дНТФ»,
- 0,5х(N+1) мкл обратной транскриптазы,

где N+1 – количество анализируемых на наличие РНК HCV образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.

ВНИМАНИЕ! Обратную транскриптазу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше.

7.2.3 Перенести пробирки в помещение для выделения НК.

7.2.4 По 3,5 мкл ОТ-смеси внести в пробирки с выделенным образцом НК и в пробирку «К-», прошедший этап выделения НК.

7.2.5 Пробирки встряхнуть на вортексе в течение 3-5 с и осадить капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с.

7.2.6 Пробирки поместить в термостат и инкубировать при температуре 40 °С в течение 30 мин, затем при температуре 95 °С в течение 5 мин.

7.2.7 Осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с.

Препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

Примечание №1. Полученный препарат кДНК/ДНК можно использовать также при постановке ПЦР для гепатитов A, B, D, G и вируса иммунодефицита человека (HIV). В этом случае ПЦР выполняется с использованием индивидуальных для каждой инфекции комплектов реагентов и программ

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

амплификации, указанных в прилагаемых к наборам инструкциям. Учет и интерпретация результатов выполняется также согласно прилагаемым к наборам инструкциям.

При необходимости постановки ПЦР для детекции более четырёх инфекций:

1. К полученному препарату кДНК/ДНК необходимо добавить 20 мкл буфера для растворения.

2. Пробирки встряхнуть на вортексе в течение 3-5 с.

3. Осадить капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с.

4. Перейти к выполнению п.7.3.

Примечание №2. При необходимости допускается хранение кДНК/ДНК при температуре минус 20 °С не более 1 мес.

7.3 ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

7.3.1 Разморозить при комнатной температуре (18-25 °С) ПЦР-буфер из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации, затем тщательно перемешать на вортексе и осадить капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с.

7.3.2 Промаркировать необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации с учетом пробирок для положительного контрольного образца «К+» и отрицательного контрольного образца «К-». При использовании ПЦР-детектора для учета результатов амплификации (формат «Flash») промаркировать дополнительно две пробирки «ФОН» для контроля фона флуоресценции.

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

7.3.3 В отдельной пластиковой пробирке, предварительно перемешав реагенты, приготовить смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq:

- 10х(N+1) мкл ПЦР-буфера,
- 0,5х(N+1) мкл полимеразы ТехноТаq,

где N+1 - количество анализируемых образцов с учётом «К-» и «К+» (N) с запасом на 1 образец.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше времени.

Смесь можно хранить при комнатной температуре не более 1 ч.

7.3.4 Перемешать приготовленную смесь ПЦР буфера с полимеразой ТехноТаq на вортексе и осадить капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с.

7.3.5 Во все амплификационные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл тщательно перемешанной смеси ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq.

7.3.6 В пробирки, маркированные «ФОН», внести по 10 мкл ПЦР-буфера.

7.3.7 В каждую пробирку добавить (при необходимости) по 1 капле минерального масла, закрыть пробирки.

7.3.8 Пробирки перенести в помещение, предназначенное для выделения НК из крови.

7.3.9 Внести в амплификационные пробирки (кроме пробирок «К-», «К+» и «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК/ДНК.

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

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы ДНК/кДНК в амплификационные пробирки наконечниками с фильтрами.

7.3.10 В пробирки, промаркированные «К-» и «ФОН», внести по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК и обратную транскрипцию. В пробирку, маркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.3.11 Центрифугировать пробирки при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с.

7.3.12 Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведенном в таблицах 1-7 с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл.

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

Таблица 1. Формат **«Форез»**. Режим амплификации для амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»)
Алгоритм регулирования: «точный»

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	94 °С	1 мин 30 с	1
2.	94 °С 64 °С 72 °С	20 с 5 с 5 с	5
3.	94 °С 64 °С 72 °С	5 с 5 с 5 с	40
4.	10 °С	Хранение	

Таблица 2. Формат **«Flash»**. Режим амплификации для амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»)
Алгоритм регулирования: «точный»

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	94 °С	1 мин	1
2.	94 °С 64 °С 67 °С	5 с 5 с 5 с	5
3.	94 °С 64 °С 67 °С	1 с 5 с 5 с	40
4.	10 °С	Хранение	

Таблица 3. Формат **«Real-time»**. Режим амплификации для детектирующего амплификатора **ДТ-322** (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °С 94 °С	2 мин 1 мин	1
2.	94 °С 64 °С*	10 с 20 с	50
3.	10 °С	Хранение	

*- регистрация результатов

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

Примечание. Возможно проведение амплификации на приборе ДТ-322 по режиму амплификации приведенному в таблице 4.

Таблица 4. Формат **«Real-time».** Режим амплификации для детектирующего амплификатора **ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96** (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	94 °С	5 мин	1
2.	94 °С 62 °С*	10 с 20 с	50
3.	10 °С	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 5. Формат **«Real-time».** Режим амплификации для амплификатора **iCycler iQ** (Bio-Rad Laboratories)

Режим для dynamicwf.tmo			
№№ п.п	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °С 94 °С	30 с 5 мин	1
2.	94 °С 62 °С	20 с 30 с	5
3.	80 °С*	20 с	2
Режим амплификации			
1.	94 °С 62 °С*	10 с 20 с	45
2.	10 °С	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 6. Формат **«Real-time».** Режим амплификации для амплификатора **iCycler iQ5** (Bio-Rad Laboratories)

с использованием Persistent Well Factor			
№№ п.п	Температура	Время	Количество циклов
1.	94 °С	5 мин	1
2.	94 °С 62 °С*	10 с 20 с	50
3.	10 °С	1 мин	1

*- регистрация результатов

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

Таблица 7. Формат **«Real-time».** Режим амплификации для амплификатора **Rotor-Gene Q** (Qiagen)

№	Температура	Время	Количество циклов
1	80 °C	300 с	1
2	94 °C 58 °C 62 °C *	10 с 5 с 25 с	50

*- регистрация результатов

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов, свяжитесь с представителем компании для уточнения программы амплификации.

Примечание: При работе с наборами в формате «Flash» готовые нормировочные пробирки («ФОН») допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК. Нормировочные пробирки хранить при 2-8 °C в течение 1 месяца в темном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (18-25 °C), для чего за 1 ч до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-ДЕТЕКТОРА

После прохождения реакции амплификации пробирки поместить в ПЦР-детектор, оформить протокол и провести регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10, для внутреннего контроля – 2,50).

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

8.2 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство по эксплуатации» для ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96).

8.3 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА iCycler iQ и iCycler iQ5 (BIO-RAD LABORATORIES)

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство пользователя» для iCycler iQ и iCycler iQ5).

8.4 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА Rotor-Gene Q (Qiagen)

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство пользователя» для Rotor-Gene Q).

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

8.5 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА.

8.5.1 Открыть крышки пробирок с продуктами амплификации и проколоть в парафине отверстие диаметром примерно 2-3 мм с помощью стальной проволоки. После прокалывания каждой пробирки проволоку промыть в емкости с водопроводной водой.

8.5.2 Для приготовления буфера для электрофореза содержимое пакета со смесью для электрофореза перенести в мерную колбу объёмом 1 л, добавить приблизительно 700 мл дистиллированной воды, перемешать до полного растворения и довести дистиллированной водой до метки.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза можно хранить при комнатной температуре (18-25 °С) в течение 1 недели или при температуре 2-8 °С в течение 1 мес.

8.4.3 Заполнить камеру для электрофореза буферным раствором для электрофореза и поместить пластину с агарозным гелем в камеру для электрофореза.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза должен покрывать пластину с гелем слоем приблизительно 3-5 мм. При работе с агарозным гелем следует обязательно надевать резиновые перчатки!

8.4.4 Осторожно внести 7,0 мкл продуктов амплификации из каждой амплификационной пробирки в соответствующую лунку агарозного геля под буферный раствор.

8.4.5 Установить крышку камеры для электрофореза и подключить источник постоянного тока. Электрофорез проводить при напряжении 20 вольт/см в течение

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

10 мин (при ширине камеры 10 см напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 200 В).

8.4.6 После окончания электрофореза отключить источник постоянного тока, снять крышку с камеры.

8.4.7 Вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины, подцепив его с края, и поместить на экран трансиллюминатора.

8.4.8 Надеть защитную маску или установить защитный экран, включить трансиллюминатор и проанализировать полученные результаты. Продукт амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ПЦР-ДЕТЕКТОРА ИЛИ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА

9.1.1 Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором.

9.1.2 В биологических образцах, содержащих РНК вируса гепатита С (специфический продукт):

- программа ПЦР-детектора фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается;

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

• детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции для специфического продукта.

9.1.3 В биологических образцах, не содержащих РНК вируса гепатита С:

• программа ПЦР-детектора при положительном результате амплификации внутреннего контрольного образца фиксирует отрицательный результат;

• детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции внутреннего контрольного образца и отсутствие экспоненциального роста кривой для специфического продукта.

9.1.4 Результат оценивается как недостоверный в случае:

• отрицательного результата на наличие РНК вируса гепатита С и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца (ПЦР-детектор).

• отсутствия экспоненциального роста уровня флуоресценции для специфического продукта и для внутреннего контрольного образца (детектирующий амплификатор).

Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате РНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата кДНК, либо повторное выделение препарата РНК, либо повторное взятие клинического материала.

9.1.5 Программа ПЦР-детектора фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфического продукта попадает в зону

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

неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учет не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.1.4).

9.1.6 При получении положительного результата (ПЦР-детектор) или экспоненциального роста флуоресценции (детектирующий амплификатор) для специфического продукта в отрицательном контрольном образце «К-» результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

9.2 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

9.2.2 В положительных образцах должны быть видны полосы оранжево-красного цвета на уровне полосы положительного контрольного образца, соответствующие фрагменту генома вируса гепатита С размером 253 п.н. Наличие или отсутствие полосы, соответствующей внутреннему контрольному образцу размером 480 п.н., в этом случае в учет не принимают.

9.2.3 В отрицательных образца, в том числе в отрицательном контрольном образце, светящиеся полосы оранжево-красного цвета, соответствующие фрагменту генома вируса гепатита С размером 253 п.н. должны отсутствовать, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 480 п.н., должна быть отчетливо видна.

9.2.4 В случае отсутствия в исследуемом образце полосы оранжево-красного цвета, соответствующей фрагменту генома вируса гепатита С размером 253 п.н. и

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

отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контрольному образцу размером 480 п.н. результат считают недостоверным.

Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате РНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата кДНК, либо повторное выделение препарата РНК, либо повторное взятие клинического материала.

9.2.5 В случае наличия полосы, соответствующей фрагменту генома вируса гепатита С размером 253 п.н., в отрицательном контрольном образце «К-» результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

Таблица 7. Интерпретация результатов.

Образец	Специфический продукт	Внутренний контрольный образец (ВК)	Вариант ответа
Образец плазмы	+	Не учитывать	Обнаружена РНК вируса HCV
	-	+	Не обнаружена РНК вируса HCV
	-	-	Недостоверный результат
Отрицательный контрольный образец	-	+	Отрицательный
Положительный контрольный образец	+	-	Положительный

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

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Срок годности набора – 9 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

10.2 Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности. Допускается хранение ПЦР-буфера, минерального масла и положительного контрольного образца при температуре от 2 °С до 8 °С.

10.3 Комплект реагентов для выделения НК, комплект реагентов для детекции ДНК, пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации, следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора.

10.4 Смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq следует хранить при температуре 18-25 °С не более 1 ч.

10.5 Раствор буфера для электрофореза можно хранить при комнатной температуре (18-25 °С) не более 7 дней или при температуре от 2 °С до 8 °С не более 1 мес.

10.6 Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.7 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

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

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением сроком годности, и неиспользованные реактивы, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

11.2 Упаковка относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора – 9 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, к.6, а/я 181. тел./факс +7 (495) 980-45-55, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки: 8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный), E-mail: hotline@dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/support/

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