

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2022/18157 от 31 августа 2022 года**В данном вкладыше приведена информация для набора реагентов HCV.** Перед началом работы изучите инструкцию.

Набор реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени HCV

REF**R3-P613-S3/9 (фасовка S, стрипы)**
R3-P613-23/9 (фасовка S, пробирки)

Информация о наборе реагентов

Назначение:

Набор реагентов предназначен для качественного определения РНК вируса гепатита С в биологическом материале человека (плазма крови) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Специализированное оборудование:

Амплификаторы детектирующие «ДТпрайм», «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология») или CFX96 (Bio-Rad).

Время проведения анализа (с учётом пробоподготовки): от 2,5 часов.**Количество исследуемых образцов:**

96 (включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов). Производитель гарантирует достаточность реагентов: 6 независимых процедур исследования по 14 клинических образцов.

Состав набора реагентов:

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-розового цвета под воскообразным белым слоем	96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок	по 15 мкл
ОТ-ПЦР-буфер "V"	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 810 мкл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов ¹		12 шт.	

Т а б л и ц а 1 - Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5
РНК HCV	ВК*	-	-

* - Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"

¹ - входят в состав набора реагентов при расфасовке смеси для амплификации в стрипы

Проведение анализа

1 Выделение РНК

Для выделения РНК HCV из плазмы крови валидирован Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот вирусов из плазмы крови с предварительным концентрированием (ПРОБА-НК-УЛЬТРА), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия (РУ № РЗН 2022/16810).

Внутренний контрольный образец. В качестве внутреннего контрольного образца при выделении РНК использовать внутренний контрольный образец РНК-ВК "А" из набора реагентов HCV. РНК-ВК "А" следует использовать в объеме **10 мкл на образец**.

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением РНК из биологического материала необходимо провести через все этапы пробоподготовки **отрицательный контрольный образец** (из состава набора реагентов «ПРОБА-НК-УЛЬТРА»).

2 Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации.

ВНИМАНИЕ! При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы», строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

2.1 Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого исследуемого образца, для отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+).

Пример: Необходимо проанализировать 6 образцов. Нужно промаркировать 6 пробирок для исследуемых образцов, одну для «К-» и одну для «К+». Общее количество пробирок – 8.

2.2 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирок «ОТ-ПЦР-буфер» и «Фермент Taq/RT» и центрифугируйте в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

2.3 Приготовьте смесь ОТ-ПЦР-буфера "V" с ферментом Taq/RT. Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 15 × (N+1) мкл ОТ-ПЦР-буфера "V",
 - 0,5 × (N+1) мкл фермента Taq/RT,
- где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К-» и «К+».

2.4 Встряхните пробирку в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Смесь ОТ-ПЦР-буфера "V" с ферментом Taq/RT необходимо готовить непосредственно перед использованием, она должна быть использована в течение одного часа после приготовления.

2.5 Добавьте в каждую промаркированную пробирку, не повреждая слой парафина, по 15 мкл смеси ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT.

2.6 Встряхните пробирки с исследуемыми и контрольными образцами в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации следует перед внесением РНК открывать крышки только тех пробирок/стрипов, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Закрывайте пробирки/стрипы плотно. Препараты РНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

2.7 Внесите, не повреждая слой парафина, в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 20 мкл полученного из образцов препарата РНК. В пробирки «К-», «К+» РНК не вносится.

2.8 Внесите, не повреждая слой парафина, в пробирку, промаркированную «К-», 20 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК. Внесите, не повреждая слой парафина, в пробирку, промаркированную «К+», 20 мкл положительного контрольного образца.

2.9 Центрифугируйте пробирки/стрипы в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.

2.10 Установите все пробирки/стрипы в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 50 мкл, по программе амплификации, приведённой в таблицах 2 - 3. При использовании приборов серии ДТ: запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». Параметры, которые вводят при создании нового теста (программа амплификации, используемые каналы детекции, объём реакционной смеси и т.п.) в приборах серии ДТ, можно загрузить в виде готового файла с параметрами теста. Для удобства работы при первом проведении ОТ-ПЦР загрузите готовый файл с параметрами теста «HCV». Далее и при последующих постановках добавьте в протокол тест «HCV», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ОТ-ПЦР.

3 Регистрация и учёт результатов ПЦР

проводится автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов. Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 4. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов. При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 (Bio-Rad) следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression) и исключить из анализа первые 5 циклов (Analyze Date from Cycle 5 to 50).

Т а б л и ц а 2 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	47	15	0	1		Цикл
2	95	5	0	1		Цикл
3	95	0	10	50	√	Цикл
	62	0	20			
4	10 ¹	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений

Т а б л и ц а 3 – Программа амплификации для амплификатора CFX96

№ блока (Step)	Температура, °C	Время, мин:сек	Количество циклов (повторов)
1	47	15:00	1
2	95	5:00	1
3	95	0:10	50
4	59 √	0:20	

√ - режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по каналам Fam и Hex при 59 °C

Т а б л и ц а 4 - Интерпретация результатов ПЦР

Результат по каналу детекции Fam (PHK HCV)	Результат по каналу детекции Hex (внутренний контроль)	Интерпретация результата
Анализируемые образцы		
Ср/Сq указан	Не учитывается	Обнаружена PHK HCV
Ср/Сq не указан	Ср/Сq ≤ 35	Не обнаружена PHK HCV
Ср/Сq не указан	Ср/Сq > 35 либо не указан	Недостовверный результат
Отрицательный контрольный образец		
Ср/Сq не указан	Ср/Сq ≤ 35	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец		
Ср/Сq указан	Не учитывается	Положительный результат Результаты постановки валидны

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C

Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов. Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток. Допускается транспортирование фермента Taq/RT в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С не более 5 суток.

Все компоненты набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Пробирки/стрипы со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить в защищённом от света месте.

Фермент Taq/RT следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов HCV, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Символы, используемые при маркировке набора реагентов

	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Адрес изготовителя
	Годен до		Серия набора
	Не допускается воздействие солнечного света		Не стерильно
	Каталожный номер		Количество тестов
	Дата изготовления		