



1055-1 2024-08-13



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) и его генотипирования
методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП

Регистрационное удостоверение

№ ФСР 2009/04071 от 07 августа 2024 года

Каталожный номер:

R4-P604-23/2

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1	НАЗНАЧЕНИЕ	3
2	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	3
2.1	Принцип действия	3
2.2	Состав набора	4
2.3	Время проведения анализа	5
2.4	Количество определений.....	5
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	6
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	7
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	7
6.1	Взятие образцов периферической крови	7
6.2	Транспортирование и хранение исследуемого материала	7
6.3	Получение плазмы.....	7
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	8
7.1	Выделение нуклеиновых кислот из биологического материала	8
7.2	Проведение реакции обратной транскрипции.....	9
7.3	Проведение полимеразной цепной реакции	10
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	12
9	ПРОВЕДЕНИЕ ДЕТЕКЦИИ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР.....	13
10	УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	15

1 НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2 Набор может быть использован в клинично-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике для диагностики вируса гепатита С и наиболее распространенных на территории России генотипов HCV (1a, 1b, 2 и 3a/3b) *in vitro*.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип действия

Набор реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП 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 наборе реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП в реакционную смесь введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами.

ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации искомой нуклеиновой кислоты (НК) и внутреннего контрольного образца (ВК), мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации кДНК вируса гепатита С и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР следует использовать детектирующие амплификаторы.

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

Набор состоит из трёх комплектов реагентов:

Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот («Проба-НК»)

включает:

- лизирующий раствор – 1 флакон (15 мл);
- реагент для преципитации – 1 флакон (20 мл);
- промывочный раствор №1 – 1 флакон (25 мл);
- промывочный раствор №2 – 1 флакон (15 мл);
- буфер для растворения – 2 пробирки (по 1,25 мл);
- отрицательный контрольный образец – 1 пробирка (1,5 мл);
- внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – 1 пробирка (500 мкл);
- внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) – 1 пробирка (500 мкл).

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

Комплект реагентов для обратной транскрипции РНК включает:

- буферный раствор для обратной транскрипции «ОТ-буфер» – 1 пробирка (100 мкл);
- смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) и праймера для обратной транскрипции «Праймер ОТ-НСV+дНТФ» – 1 пробирка (50 мкл);
- обратную транскриптазу – 1 пробирка (25 мкл).

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации включает:

- смеси для амплификации, запечатанные парафином:
 - «Вирус гепатита С (НСV), НCV-общий» – 50 пробирок (по 20 мкл);
 - «Вирус гепатита С (НСV), 1a тип» – 50 пробирок (по 20 мкл);
 - «Вирус гепатита С (НСV), 1b тип» – 50 пробирок (по 20 мкл);
 - «Вирус гепатита С (НСV), 2 тип» – 50 пробирок (по 20 мкл);
 - «Вирус гепатита С (НСV), 3a/3b тип» – 50 пробирок (по 20 мкл);
- буферный раствор «ПЦР-буфер» - 5 пробирок (по 500 мкл);
- минеральное масло - 5 пробирок (по 1,0 мл);
- Taq-полимеразу – 2 пробирки (по 50 мкл) и 1 пробирка (25 мкл);
- положительные контрольные образцы (К+):
 - «НСV-общий» – 1 пробирка (75мкл);
 - «НСV, 1a тип» – 1 пробирка (75 мкл);
 - «НСV, 1b тип» – 1 пробирка (75 мкл);
 - «НСV, 2 тип» – 1 пробирка (75 мкл);
 - «НСV, 3a/3b тип» – 1 пробирка (75 мкл).

В состав смеси для амплификации входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентные ДНК-зонды.

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 часов.

2.4 Набор рассчитан на проведение 50 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 В образцах плазмы крови человека, содержащих РНК вируса гепатита С генотипов 1a, 1b, 2, 3a/3b, после проведения реакций обратной транскрипции и амплификации детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции для соответствующего генотипа HCV и для специфического продукта «HCV-общий».

3.2 В образцах плазмы крови человека, содержащих РНК вируса гепатита С иных генотипов (не указанных в п.3.1), после проведения реакций обратной транскрипции и амплификации детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции для специфического продукта «HCV-общий» и отсутствие экспоненциального роста уровня флуоресценции для всех 4 генотипов, предложенных в данном наборе.

3.3 В образцах плазмы крови человека, не содержащих РНК вируса гепатита С, результат исследования должен быть отрицательным.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 26 (ГОСТ Р 51609-2000).

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, 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», с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

При работе с набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

Выделение РНК следует проводить в боксах биологической безопасности II-III класса с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ОТ и ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

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

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

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

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится ОТ и ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

- амплификатор детектирующий ДТ-322 или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»), iCycler iQ (Bio-Rad) или аналоги;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный на 40-95 °С;
- 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; 2,5 мл;
- пипетки автоматические одноканальные с переменным объёмом: 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для автоматических пипеток с маркировкой "RNAase-free, DNAase-free" объемом 1-20 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские;
- контейнер с дезинфицирующим раствором.

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.

6.2 Транспортирование 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 температуре от 2 °С до 8 °С.

6.3 Получение плазмы

6.3.1 Пробирки с кровью центрифугировать при 3000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

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

Полученная плазма готова для выделения нуклеиновых кислот.

При необходимости хранить полученную плазму при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более 3 месяцев.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание - Для генотипирования можно использовать кДНК, полученную при работе с наборами реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С и ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный. В этом случае необходимо выполнить пп.7.2.8-7.2.9 (разведение кДНК буфером для растворения) и п.7.3 («Проведение полимеразной цепной реакции»).

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 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 предварительно перемешанного 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 по 100 мкл предварительно перемешанного исследуемого образца (плазмы крови). В пробирку, промаркированную «К-», добавить 100 мкл отрицательного контрольного образца.
- 7.1.5 Плотнo 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, встряхнуть на вортексе в течение 3-5 с дважды.
- 7.1.8 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре (18-25 °С).
- 7.1.9 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.1.10 Добавить к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки. Необходимо переворачивать каждую пробирку индивидуально.
- 7.1.11 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.1.12 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.1.13 Добавить к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки. Необходимо переворачивать каждую пробирку индивидуально.

- 7.1.14 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.1.15 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 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, встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с, осадить капли центрифугированием пробирок в течение 3-5 с.
- 7.1.18 Прогреть пробирки при 65 °С в течение 10 мин.
- 7.1.19 Осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

Полученный препарат РНК необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции. Препарат РНК не подлежит хранению.

7.2 Проведение реакции обратной транскрипции

- 7.2.1 Разморозить содержимое пробирок ОТ-буфер и «Праймер ОТ-НСV 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.
- 7.2.2 В отдельной пластиковой пробирке приготовить ОТ-смесь путем смешивания ОТ-буфера, праймера ОТ-НСV и дНТФ и обратной транскриптазы:
 - 2,0х(N+1) мкл ОТ-буфера;
 - 1,0х(N+1) мкл «Праймер ОТ-НСV и дНТФ»;
 - 0,5х(N+1) мкл обратной транскриптазы,где N+1 – количество анализируемых на наличие РНК НCV образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.

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

- 7.2.3 Встряхнуть пробирку с ОТ-смесью на микроцентрифуге-вортексе и центрифугировать в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе при комнатной температуре.
- 7.2.4 Перенести пробирки в помещение для выделения НК.
- 7.2.5 Добавить по 3,5 мкл ОТ-смеси во все промаркированные пробирки (включая «К-»), смыть остатки ОТ-смеси пипетированием 5 раз и плотно закрыть крышки пробирок.
- 7.2.6 Пробирки встряхнуть на вортексе в течение 3-5 с и осадить капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с.
- 7.2.7 Пробирки поместить в термостат и инкубировать при температуре 40 °С в течение 30 мин, затем при температуре 95 °С в течение 5 мин.
- 7.2.8 Осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с.
- 7.2.9 К полученной кДНК добавить 10 мкл буфера для растворения из комплекта для выделения нуклеиновых кислот.

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

Препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

Примечание - При необходимости допускается хранение кДНК при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

Для каждого препарата кДНК возможно проведение исследования на наличие 4 генотипов (1a, 1b, 2, 3a/3b) вируса гепатита С. Для исследования на каждый генотип необходимо применять соответствующий комплект для ПЦР-амплификации.

«НСV-общий» - комплект реагентов для выявления вируса гепатита С, служит дополнительным контролем наличия/отсутствия РНК вируса гепатита С в исследуемом образце.

ВНИМАНИЕ! При генотипировании кДНК, полученной при работе с комплектами реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С и ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный, комплект «НСV-общий» не используется.

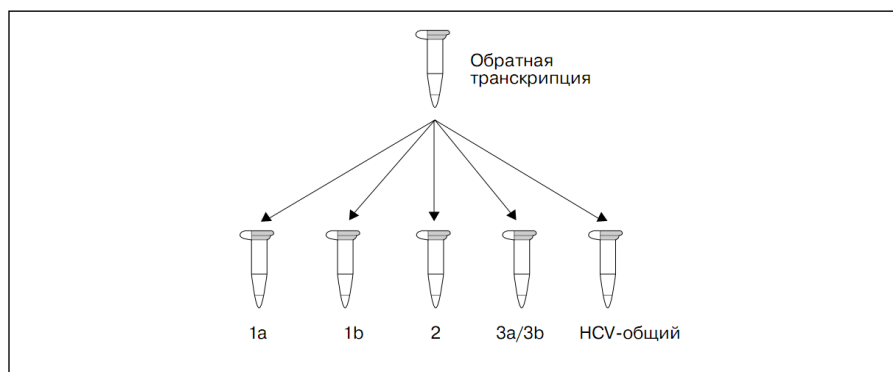


Рисунок 1 – Исследование на выявление НCV и его генотипирования

7.3 Проведение полимеразной цепной реакции

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

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 из каждого комплекта со смесью для амплификации, запечатанной парафином (1a тип, 1b тип, 2 тип, 3a/3b тип и «НСV-общий»)¹, для исследуемых образцов, положительного контрольного образца (К+), отрицательного контрольного образца (К-).

Например, для исследования пяти образцов необходимо всего промаркировать 35 пробирок: по 7 пробирок из каждого комплекта со смесью для амплификации, из них 5 пробирок для исследуемых образцов и по одной пробирке для «К+» и «К-».

¹ - при генотипировании кДНК, полученной при работе с комплектами реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С и ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный, комплект «НСV-общий» не используется в исследовании

Таблица 1 – Маркировка пробирок для исследования пяти образцов

Тест № образца	1a тип	1b тип	2 тип	3a/3b тип	«HCV-общий» ¹
1	✓	✓	✓	✓	✓
2	✓	✓	✓	✓	✓
3	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓	✓
5	✓	✓	✓	✓	✓
«K+»	✓	✓	✓	✓	✓
«K-»	✓	✓	✓	✓	✓

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

- 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера;
- 0,5 x (N+1) мкл Taq-полимеразы,

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

ВНИМАНИЕ! Taq-полимеразу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше времени.

Смесь можно хранить при температуре от 2 °C до 8 °C не более одного часа.

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

7.3.5 Во все амплификационные пробирки, не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл тщательно перемешанной смеси ПЦР-буфера с Taq-полимеразой.

7.3.6 В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла, закрыть пробирки.

7.3.7 Пробирки перенести в рабочую зону, предназначенную для выделения нуклеиновых кислот.

7.3.8 Внести в амплификационные пробирки (кроме пробирок «K-», «K+»), не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК.

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

7.3.9 В пробирки, промаркированные «K-», внести по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК и обратную транскрипцию. В пробирки, маркированные «K+», внести по 5,0 мкл положительных контрольных образцов.

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

7.3.11 Установить все пробирки в детектирующий амплификатор и провести ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл.

¹ - при генотипировании кДНК, полученной при работе с комплектами реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С и ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный, комплект «HCV-общий» не используется в исследовании

Таблица 2 – Режим амплификации для амплификатора iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	PCR/Melt Data Acquisition
Режим для dynamicwf.tmo					
1	1				
		1	00:30	80,0	
		2	05:00	94,0	
2	5				
		1	00:20	94,0	
		2	00:30	62,0	
3	2				
		1	00:20	80,0	Real Time
Режим амплификации					
4	45				
		1	00:10	94,0	
		2	00:20	62,0	Real Time
5		...	...	10,0	storage

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

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующего амплификатора серии ДТ:

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»).

8.2 Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующего амплификатора iCycler iQ (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).

9 ПРОВЕДЕНИЕ ДЕТЕКЦИИ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР

9.1 Детекция, учет и интерпретация результатов осуществляется на приборах серии ДТ (ООО «НПО ДНК-Технология») или iCycler iQ (Bio-Rad) автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 В образцах крови, содержащих РНК вируса гепатита С определенного генотипа, после проведения реакций обратной транскрипции и амплификации, детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции для специфического продукта (одного из 4-х генотипов HCV, предложенных в наборе, и «HCV-общего»).

9.3 В образцах, не содержащих РНК гепатита С, детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции внутреннего контрольного образца и отсутствие экспоненциального роста кривой для специфического продукта («HCV-общего» и всех 4-х генотипов).

9.4 В случае отсутствия экспоненциального роста уровня флуоресценции для специфического продукта («HCV-общего» и всех 4-х генотипов) и для внутреннего контрольного образца, результат оценивается как недостоверный.

9.5 При получении экспоненциального роста уровня флуоресценции по двум генотипам (например, генотипы 1a и 1b) на одном образце с интервалом по Ct более 3-х циклов, положительным считать сигнал с наименьшим значением Ct (1b), а сигнал с большим значением Ct (1a) считать перекрестной неспецифической реакцией (рис.2).

9.6 Необходимо учитывать, что для вируса гепатита С характерен высокий полиморфизм, обуславливающий большое разнообразие генотипов и субтипов. Поэтому экспоненциальный рост уровня флуоресценции для специфического продукта «HCV-общий» и отсутствие экспоненциального роста уровня флуоресценции для всех предложенных в наборе 4-х генотипов, может свидетельствовать о наличии других генотипов HCV в исследуемом образце (например, генотипы 4, 5 и 6).

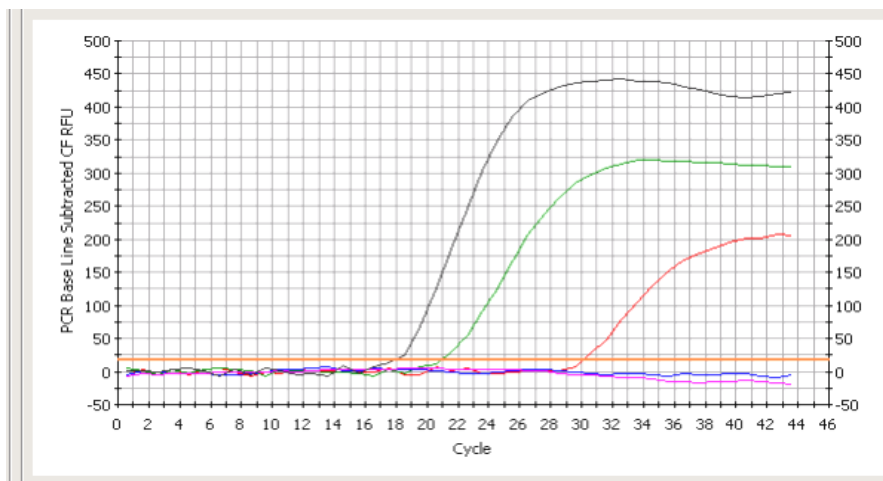


Рисунок 2 – Экспоненциальный рост уровня флуоресценции по нескольким генотипам: выявлен генотип 1b

Таблица 3 – Сводная таблица по учёту и интерпретации результатов проведённого исследования

Результат по каналу детекции FAM		Результат по каналу детекции HEX	Интерпретация результата исследования
Один из генотипов HCV (1a, 1b, 2, 3a/3b)	HCV-общий	Внутренний контроль	
Неизвестные образцы			
Cp (Ct)<40	Cp (Ct)<40	Не учитывается	Обнаружена РНК вируса гепатита С _____ генотипа
Cp (Ct)≥40 или не указан	Cp (Ct)≥40	Не учитывается	Недостоверный результат Необходимо повторить проверку, начиная с этапа выделения РНК
Cp (Ct) не указан	Cp (Ct) не указан	Cp (Ct)≤36	Не обнаружена РНК вируса гепатита С
Cp (Ct) не указан	Cp (Ct)<40	Не учитывается	Обнаружена РНК вируса гепатита С, тип не идентифицирован
Cp (Ct) не указан	Cp (Ct) не указан	Cp (Ct) не указан или Cp (Ct)>36	Недостоверный результат Необходимо повторить проверку, начиная с этапа выделения РНК
Положительный контрольный образец			
Cp (Ct)≤33	Cp (Ct)≤33	Не учитывается	Положительный результат
Отрицательный контрольный образец			
Cp (Ct) не указан	Cp (Ct) не указан	Cp (Ct)≤36	Отрицательный результат

9.7 Если для контрольных образцов значения Cp (Ct) превышают указанные в таблице 3, результат исследования недостоверный.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Срок годности набора – 6 мес.

10.2 Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.

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

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

10.5 Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.6 Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП, 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

ДНК-Технология

117587, Россия, г. Москва,

вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное,

ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12

Тел./факс +7 (495) 640-17-71

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