

«УТВЕРЖДАЮ»

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



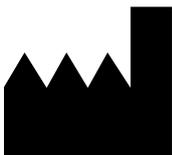
В.Г. Акимкин

«18» сентября 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV)
в клиническом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® HCV-FL»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	7
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	11
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	12
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	12
СОСТАВ	14
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	15
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	15
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	16
А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР	16
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	18
В. Анализ и интерпретация результатов	20
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	23
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	25
ПРИЛОЖЕНИЕ А	26

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	– внутренний контрольный образец
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	– положительный контроль ПЦР
К–	– отрицательный контроль ПЦР
МЕ	– международная единица
МУ	– методические указания
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ОТ	– обратная транскрипция
ПК	– положительный контроль экстракции
ПКО	– положительный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
СанПиН	– санитарные правила и нормы
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
<i>Ct</i>	– cycle threshold (пороговый цикл)
FL	– ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
<i>HBV</i>	– вирус гепатита В
<i>HCV</i>	– вирус гепатита С
<i>HDV</i>	– вирус гепатита D («Дельта»)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *HCV-FL*» предназначен для качественного определения РНК вируса гепатита С (*HCV*) в клиническом материале методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные из плазмы крови.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала с целью выявления гепатита С.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО), одновременной обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемого вируса и кДНК ВКО с гибридационно-флуоресцентной детекцией. ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

Обратная транскрипция РНК проводится с помощью фермента ревертазы (MMIv). Амплификация участка кДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых кДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

На этапе ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке проводится амплификация двух кДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
кДНК-мишень	кДНК ВКО	кДНК HCV
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	5' UTR

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 4: «ПЦР-комплект» вариант FRT

Примечание – Формы 1, 2, 3 удалены.

Форма 4 предназначена для проведения амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК.

Форма 4 рассчитана на проведение 112 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Таблица 2

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), МЕ/мл
Плазма крови	100	«РИБО-сорб», «РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	100
	200	«МАГНО-сорб»		50
	1000	«МАГНО-сорб»		10

Данные значения характеристик достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает РНК *HCV* различных генотипов. Были исследованы образцы генотипов 1a, 2b, 3a, 4a, 5, 6a в концентрации не менее 1×10^3 МЕ/мл.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана посредством добавления в реакцию геномной ДНК/РНК следующих микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее 1×10^5 копий/мл (ГЭ/мл): вирус гепатита А (*HAV*), вирус гепатита В (*HBV*), вирус гепатита D (*HDV*), вирус иммунодефицита человека первого типа, цитомегаловирус (*CMV*), вирус Эпштейна-Барр (*EBV*), вирус простого герпеса типы 1, 2 (*HSV-1,2*), вирус ветряной оспы (*VZV*), вирус герпеса человека типы 6, 8 (*HHV-6, HHV-8*), парвовирус В19 (*Parvovirus*

B19), вирус клещевого энцефалита (*TBEV*), вирус лихорадки западного Нила (*WNV*), аденовирус типы 2, 3, 7 (*HadV-2*, *HadV-3*, *HadV-7*), вирус папилломы человека типы 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 59, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* и ДНК человека в концентрации 1 мг/мл.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных микроорганизмов/вирусов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Информация об интерферирующих веществах указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой разведения стандартного образца предприятия, содержащего РНК *HCV* в концентрации 500 МЕ/мл. В качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах и разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	10	100	40	100
Отрицательные	10	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы 100 образцов плазмы крови.

Было сформировано две группы образцов для проведения доклинических испытаний:

1. 50 образцов плазмы крови от доноров, которые были

обследованы на наличие маркеров вирусных гепатитов (HBsAg, anti-HCV) и маркеров синдрома цитолиза (АЛТ, АСТ).

- 50 образцов плазмы крови от пациентов с установленным диагнозом «хронический вирусный гепатит С» и определялись как положительные при тестировании набором реагентов «АмплиСенс® HCV / HBV / HIV-FL» (ПУ № ФСР 2009/06187).

Таблица 4

Результаты тестирования набора реагентов «АмплиСенс® HCV-FL» в сравнении с референтным методом

Вид исследуемого материала	Результаты применения «АмплиСенс® HCV-FL»		Результаты применения референтного метода ¹	
			положительных	отрицательных
Плазма крови	Всего использовано 100 образцов	положительных	50	0
		отрицательных	0	50

Таблица 5

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиСенс® HCV-FL»

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
Плазма крови	100 (92,89 – 100) %	100 (92,89 – 100) %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических)

¹ В качестве референтного метода использовался набор реагентов «АмплиСенс® HCV / HBV / HIV-FL» (ПУ № ФСР 2009/06187).

мероприятий» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности форма 4 набора реагентов безопасна.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку², биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Вакуумная система забора крови типа Vacuette.
2. Центрифуга медицинская с принадлежностями.
3. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

4. Комплект реагентов для экстракции РНК – «РИБО-сорб» (РУ ФСР 2008/03993), «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» вариант 100-200 или вариант 100-1000 (РУ № ФСР 2010/07265).
5. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

6. Автоматическая станция для экстракции НК «открытого типа» (например, MicroLab STARlet (Hamilton Bonaduz AG («Гамильтон Бонадуц АГ»), Швейцария)).
7. Комплект реагентов для экстракции РНК на автоматической станции «открытого типа» (например, «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265)).
8. Набор необходимых расходных материалов для автоматической станции.

ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 мкл.
7. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл.
8. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
9. Вортекс.
10. Автоматические дозаторы переменного объема.
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
12. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
13. Емкость для сброса наконечников.
14. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.
15. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), CFX96 (Bio-Rad

Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399)), «ДТ-96» / «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01250, РУ № ФСР 2011/10229)).

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служит плазма крови.

Взятие крови проводится утром натощак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой диаметром 0,8 – 1,1 мм в пробирку с 6% раствором ЭДТА (K_2 ЭДТА или K_3 ЭДТА) или с цитратом натрия в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется, и экстракция РНК станет невозможной), и хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 6 ч. Пробирку с цельной кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g при комнатной температуре. Полученную плазму переносят в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 2,0 мл.

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование плазмы крови при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток.

Допускается использование сыворотки крови. Диагностическая чувствительность ввиду соосаждения вирусных частиц при ретракции сгустка может быть существенно снижена. Хранить сыворотку можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Образцы плазмы крови не требуют предварительной подготовки.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля эффективности экстракции РНК и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО *ICZ-гес*), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО *ICZ-гес*, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Ограничения по использованию проб

Непригодными для исследования являются:

- образцы плазмы крови с гемолизом;
- образцы плазмы крови, подвергшиеся многократному замораживанию-оттаиванию;
- образцы плазмы крови, полученные из образцов крови, взятой в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в клиническом материале, используемом для исследования (см. табл. 6).

Были протестированы:

- образцы ВГС-негативной плазмы крови без добавления и с добавлением эндогенных потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в таблице 6. Анализу подвергались как образцы, не содержащие РНК *HCV*, так и образцы с добавлением стандартного образца предприятия до конечной концентрации РНК *HCV* 500 МЕ/мл;

- образцы плазмы крови, полученные из цельной крови, забранной в пробирки с K₂ЭДТА и K₃ЭДТА в качестве антикоагулянтов.

Таблица 6

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Эндогенные вещества	Гемоглобин	160 г/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено
		250 г/л	Не обнаружено
	Триглицериды	3,7 ммоль/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено
		37 ммоль/л	Не обнаружено
	Билирубин	21 мкмоль/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено
		210 мкмоль/л	Не обнаружено
Белок	85 г/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено	
	120 г/л	Не обнаружено	
Экзогенные вещества	Лития гепарин ³	12 МЕ/мл	<u>Обнаружено</u>
	Калий ЭДТА ³	2 мг/мл	Не обнаружено

³ В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калий ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл, лития гепарин – в концентрации от 12 до 30 МЕ/мл.

СОСТАВ

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК вируса гепатита С (HCV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HCV	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,3	4 пробирки
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	4 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMiv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	4 пробирки
KB2 HCV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ПКО-1-HCV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
ВКО ICZ-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	4 пробирки

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- проведение обратной транскрипции и амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб». Порядок работы с комплектами реагентов «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб» смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции, порядок работы с комплектом реагентов «РИБО-сорб» смотрите в Приложении А.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО ICZ-rec**.

Объем **ВКО ICZ-rec** – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-НСV**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб»:

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа».

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО ICZ-rec**.

Объем **ВКО ICZ-rec** – **10 мкл** в каждую пробирку.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

Объем исследуемого образца:

- 200 мкл;
- 1000 мкл.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-НСV**.

Объем элюции – **70 мкл** (или **75 мкл** при экстракции с помощью MicroLab STARlet (Hamilton Bonaduz AG («Гамильтон Бонадуц АГ»), Швейцария)).

РНК-пробы могут храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение препарата при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 мес, при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Выбор пробирок для ОТ-ПЦР зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме реального времени.

Для внесения в пробирки реагентов, проб РНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы РНК – 10 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FL НCV**, **5 мкл ПЦР-буфера-С**, **0,25 мкл RT-G-mix-2**, **0,5 мкл Полимеразы (TaqF)** и **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на одну реакцию.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-ПЦР.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

2. Разморозить все реагенты ПЦР-комплекта, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ОТ-ПЦР-смеси-1-FL HCV**, **ПЦР-буфера-С**, **RT-G-mix-2**, **Полимеразы (TaqF)** и **ТМ-Ревертазы (MMIv)**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием. Приготовленная смесь не хранится.
4. Отобрать необходимое количество пробирок для ОТ-ПЦР с учетом количества исследуемых и контрольных образцов (см. табл. 7).
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. Используя наконечник с фильтром, в пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл пробы РНК**, экстрагированной из ПКО-1-*HCV*.
 - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл пробы РНК**, экстрагированной из ОКО.
 - в) **положительный контроль ОТ-ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл KB2 HCV**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл буфера для элюции**.

Схема приготовления реакционных смесей

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		Объем реактивов на указанное количество исследуемых точек с запасом на один образец				
		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Число исследуемых образцов	Число проб в ПЦР ⁴	ОТ-ПЦР-смесь-1-FL <i>HCV</i>	ПЦР-буфер-С	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
4	7	80	40	2,0	4,0	2,0
6	9	100	50	2,5	5,0	2,5
8	11	120	60	3,0	6,0	3,0
10 ⁵	13	140	70	3,5	7,0	3,5
12	15	160	80	4,0	8,0	4,0
14	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 ⁶	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

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 8, 9).

⁴ Число исследуемых образцов + 2 контроля этапа экстракции РНК + 1 контроль ОТ-ПЦР, (N+3, N - количество исследуемых образцов).

⁵ Панель из 12 пробирок на экстракцию.

⁶ Панель из 24 пробирок на экстракцию.

Таблица 8

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-2 RG» для приборов роторного типа⁷

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold 1/Удерж. темп-ры 1	50	15 мин	–	1
Hold 2/Удерж. темп-ры 2	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HBV*, генотипирования *HCV* и др.).

Примечание – Каналы ROX/Orange и Cy5/Red включаются, если проводятся тесты, для которых используются эти каналы.

Таблица 9

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-2 iQ» для приборов планшетного типа⁸

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 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	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HBV*, генотипирования *HCV* и др.).

Примечание – Каналы ROX и Cy5 включаются, если

⁷ Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киagen ГмбХ»), Германия).

⁸ Например, «ДТ-96» / «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), CFX 96 (Bio-Rad, США).

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

проводятся тесты, для которых используются эти каналы.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	кДНК ВКО	кДНК HCV

Анализ полученных результатов проводят с помощью ПО прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Для анализа и интерпретации результатов используют значения порогового цикла (C_t), полученные на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 11

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)		Результат
FAM	JOE	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	кДНК HCV НЕ обнаружена
больше или меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	кДНК HCV обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	Невалидный*

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции РНК и ОТ-ПЦР в соответствии с табл. 12 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует
ПК	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
К+	ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
К-	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует

При наличии отклонений результатов для контролей, от указанных выше, интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции (ПК) и/или положительного контроля ОТ-ПЦР (К+):
 - а) по каналу для флуорофора JOE значение порогового цикла (Ct) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов, в которых не обнаружена кДНК

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

- HCV*. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых не обнаружена кДНК *HCV*, начиная с этапа экстракции РНК.
- б) по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
- а) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена кДНК *HCV*. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК *HCV*, начиная с этапа экстракции РНК.
 - б) по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.
3. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Форма 4. «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Допускается хранение RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смеси-1-FL HCV, KB2 HCV, буфера для элюции, ОКО, ПКО-1-HCV и ВКО ICZ-rec при температуре ниже минус 24 °С. Не допускается замораживание/оттаивание KB2 HCV, ПКО-1-HCV и ВКО ICZ-rec более двух раз. После размораживания ПКО-1-HCV, KB2 HCV и ВКО ICZ-rec хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 мес. ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HCV хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции АмплиСенс® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно!



Код партии



Содержимого достаточно
для проведения n тестов



Медицинское изделие для
диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по
применению



Предел температуры



Не допускать воздействия
солнечного света



Верхняя граница
температурного диапазона



Дата изготовления



Изготовитель

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб»

1. Прогреть **лизирующий раствор** и **раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Промаркировать пробирки.
3. В каждую пробирку внести по **10 мкл ВКО ICZ-rec**.
4. В пробирки с ВКО внести по **450 мкл лизирующего раствора**.

*При большом количестве образцов для облегчения процедуры экстракции допускается смешивание в отдельном одноразовом флаконе **лизирующего раствора** и **ВКО ICZ-rec** (из расчета на один образец 450 мкл лизирующего раствора и 10 мкл ВКО) с последующим внесением по **450 мкл смеси** в заранее подготовленные пробирки объемом 1,5 мл.*

5. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.
6. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) с **лизирующим раствором** и **ВКО** внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-НСV**.
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) с **лизирующим раствором** и **ВКО** внести **100 мкл ОКО**.
8. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить капли жидкости с крышек пробирок кратким центрифугированием.
9. Поместить пробирки с образцами и контролями в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**. Осадить капли конденсата с крышки кратким центрифугированием (пункт 9 выполнять только в случае одновременной экстракции РНК гепатита С и ДНК гепатита В и/или РНК гепатита D).
10. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл ресуспендированного сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить на 10 мин при комнатной температуре,

- тщательно перемешивая каждые 2 мин.
11. Центрифугировать пробирки для осаждения сорбента на центрифуге при **7 тыс g** (например, 10 тыс об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.
 12. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 13. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на центрифуге при **7 тыс g** в течение **1 мин**.
 14. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 15. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на центрифуге при **7 тыс g** в течение **1 мин**.
 16. Не захватывая осадок удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 17. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя п. **15-16**.
 18. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на центрифуге при **7 тыс g** в течение **1 мин**.
 19. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 20. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре **60 °C** на **12-15** мин для подсушивания сорбента.
 21. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Закрывать пробирки и перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **60 °C** на **2-3 мин**.
 22. Перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при **12-13 тыс g** (например, 13,4 тыс об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение **1 мин**. Надосадочная

жидкость содержит очищенную РНК.

РНК-пробы готовы к постановке ОТ-ПЦР, которую рекомендуется проводить сразу же после получения очищенной РНК.

Отбор очищенной РНК для проведения ОТ-ПЦР проводить осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге при 12-13 тыс g в течение 1 мин.

РНК-пробы могут 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 от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 мес, при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.