

«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

« 20 »  20 24



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

«АмплиСенс® HCV-генотип-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

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	9
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	10
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	11
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	12
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	13
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	13
СОСТАВ.....	15
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	17
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	17
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ РНК	18
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	18
А1. Подготовка проб для амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-g1-4.....	18
А2. Подготовка проб для амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-g1-6.....	20
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	23
В. Анализ и интерпретация результатов.....	24
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	28
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	30

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	– экзогенный внутренний контрольный образец
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	– комплиментарная ДНК
К+	– положительный контроль ПЦР
К–	– отрицательный контроль ПЦР
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ОТ	– обратная транскрипция
ПКО	– положительный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
п.н.	– пара нуклеотидов
РНК	– рибонуклеиновая кислота
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>HCV</i>	– вирус гепатита С
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *HCV*-генотип-FL» предназначен для выявления и дифференциации генотипов вируса гепатита С (*HCV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Набор реагентов рекомендуется использовать после обнаружения РНК *HCV* в исследуемых образцах. Материалом для проведения ПЦР служат пробы кДНК, полученные в результате реакции обратной транскрипции РНК, экстрагированной из исследуемого материала.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

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

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования клинического материала, полученного от лиц, инфицированных вирусом гепатита С (*HCV*), вне зависимости от формы и наличия манифестации

Форма 3: **REF** R-V1-G(1-4)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0253-1-3;

Форма 6: **REF** R-V1-G(1-6)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0256-1-3 / **VER** 20.05.24 / стр. 3 из 30

заболевания.

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 клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала (плазмы крови) совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО STI-248-гес), проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемого вируса и кДНК ВКО STI-248-гес с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

Амплификация участка кДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Таq-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».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

Определение генотипа *HCV* для одного образца проводится в нескольких пробирках, в каждой пробирке дифференцируются два генотипа *HCV* или один генотип *HCV* и ВКО. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Наименование ПЦР-смеси-1-FRT	Выявляемый генотип <i>HCV</i> (область амплификации)	
1b/3a	1b (Core <i>HCV</i>)	3a (Core <i>HCV</i>)
1a/2	1a (Core <i>HCV</i>)	2 (5UTR+Core <i>HCV</i>)
ВКО/4	ВКО (искусственная синтезированная последовательность)	4 (Core <i>HCV</i>)
5a/6 ¹	5a (NS5b <i>HCV</i>)	6 (Core <i>HCV</i>)

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 3: «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-4

Форма 6: «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-6

Примечание – Формы 1, 2, 4, 5 удалены.

Форма 3 предназначена для определения генотипов 1a, 1b, 2, 3a, 4 вируса гепатита С.

Форма 6 предназначена для определения генотипов 1a, 1b, 2, 3a, 4, 5a, 6 вируса гепатита С.

Формы 3 и 6 предназначены для проведения амплификации кДНК *HCV* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять РНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК и проведения реакции обратной транскрипции.

Форма 3 рассчитана на проведение 55 тестов (165 реакций амплификации), включая контроли. Форма 6 рассчитана на проведение 55 тестов (220 реакций амплификации), включая контроли.

¹ Входит в состав «ПЦР-комплекта» вариант FRT-g1-6.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объём образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), МЕ/мл
Плазма крови	100	«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-4, «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-6	$2,5 \times 10^3$
		«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-4, «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-6	5×10^3

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает РНК *HCV* заявленных генотипов.

Оценка аналитической специфичности набора реагентов показала отсутствие перекрестных реакций между генотипами 1a, 1b, 2, 3a, 4, 5a и 6 вируса гепатита С при использовании рекомбинантных образцов (не менее 1×10^8 МЕ/мл) и образцов РНК (не менее 1×10^5 МЕ/мл), экстрагированных из плазмы крови, соответствующих генотипов *HCV*.

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 образцов. Положительные образцы представляли собой клинические образцы плазмы крови с концентрацией РНК *HCV* не менее 1×10^5 МЕ/мл.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в

Форма 3: **REF** R-V1-G(1-4)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0253-1-3;

Форма 6: **REF** R-V1-G(1-6)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0256-1-3 / **VER** 20.05.24 / стр. 6 из 30

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 таблице 3.

Таблица 3

Комплект для амплификации	Комплект для экстракции	Тип образца	Повторяемость		Воспроизводимость	
			Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
«ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-6	«РИБО-сорб»	Положительный 1a	10	100	40	100
		Положительный 1b	10	100	40	100
		Положительный 2	10	100	40	100
		Положительный 3a	10	100	40	100
		Положительный 4	10	100	40	100
		Положительный 5a	10	100	40	100
		Положительный 6	10	100	40	100
		Отрицательный	10	100	40	100
	«РИБО-преп»	Положительный 1a	10	100	40	100
		Положительный 1b	10	100	40	100
		Положительный 2	10	100	40	100
		Положительный 3a	10	100	40	100
		Положительный 4	10	100	40	100
		Положительный 5a	10	100	40	100
		Положительный 6	10	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы следующие образцы:

Таблица 4

Вид исследуемого материала	Количество образцов
Образцы плазмы крови, содержащие HCV 1a генотипа	25
Образцы плазмы крови, содержащие HCV 1b генотипа	25
Образцы плазмы крови, содержащие HCV 2 генотипа	25
Образцы плазмы крови, содержащие HCV 3 генотипа	25
Модельные образцы плазмы крови с добавлением стандартного образца предприятия, содержащего HCV 4 генотипа	25
Модельные образцы плазмы крови с добавлением стандартного образца предприятия, содержащего HCV 5a генотипа	25
Модельные образцы плазмы крови с добавлением стандартного образца предприятия, содержащего HCV 6 генотипа	25

Вид исследуемого материала	Количество образцов
Образцы плазмы крови от доноров с отсутствием маркеров вирусных гепатитов (HBsAg, anti-HCV) и маркеров синдрома цитолиза (АЛТ, АСТ)	25

Генотипическая принадлежность исследуемых образцов плазмы с HCV была определена с помощью секвенирования геномных регионов Core (720 п.н.) и NS5B (1060 п.н.) вируса HCV. Полученные нуклеотидные последовательности подвергались филогенетическому анализу с использованием метода ближайших соседей и максимального правдоподобия с помощью программы MEGA 6.0.

Таблица 5

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

Вид исследуемого материала	Определяемый анализ	Результаты применения «АмплиСенс® HCV-генотип-FL»		Результаты применения референтного метода	
				положительных	отрицательных
Плазма крови	генотип HCV 1a	Всего использовано 200 образцов	положительных	25	0
			отрицательных	0	175
	генотип HCV 1b	Всего использовано 200 образцов	положительных	25	0
			отрицательных	0	175
	генотип HCV 2	Всего использовано 200 образцов	положительных	25	0
			отрицательных	0	175
	генотип HCV 3a	Всего использовано 200 образцов	положительных	25	0
			отрицательных	0	175
	генотип HCV 4	Всего использовано 200 образцов	положительных	25	0
			отрицательных	0	175
	генотип HCV 5a	Всего использовано 200 образцов	положительных	25	0
			отрицательных	0	175
	генотип HCV 6	Всего использовано 200 образцов	положительных	25	0
			отрицательных	0	175

Таблица 6

**Диагностические характеристики набора реагентов
«АмплиСенс® HCV-генотип-FL»**

Вид исследуемого материала	Определяемый анализ	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
Плазма крови	генотип HCV 1a	100 (86,28 – 100) %	100 (97,91 – 100) %
	генотип HCV 1b	100 (86,28 – 100) %	100 (97,91 – 100) %
	генотип HCV 2	100 (86,28 – 100) %	100 (97,91 – 100) %
	генотип HCV 3a	100 (86,28 – 100) %	100 (97,91 – 100) %
	генотип HCV 4	100 (86,28 – 100) %	100 (97,91 – 100) %
	генотип HCV 5a	100 (86,28 – 100) %	100 (97,91 – 100) %
	генотип HCV 6	100 (86,28 – 100) %	100 (97,91 – 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) 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 клинично-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 реагентами. 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 набор реагентов безопасен.

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, упаковку, 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, включающая пробирки с ЭДТА.
2. Центрифуга с охлаждением до 24 тыс g.
3. Центрифуга медицинская с принадлежностями.
4. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

5. Комплекты реагентов для экстракции РНК – «РИБО-сорб» (РУ № ФСР 2008/03993), «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147).
6. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

Обратная транскрипция РНК

7. Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК – «РЕВЕРТА-L» (РУ № ФСР 2008/03994).
8. Дополнительные материалы и оборудование для обратной транскрипции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для получения кДНК на матрице РНК.

Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

9. 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 круглой 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 – при использовании прибора

Форма 3: **REF** R-V1-G(1-4)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0253-1-3;

Форма 6: **REF** R-V1-G(1-6)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0256-1-3 / **VER** 20.05.24 / стр. 11 из 30

- роторного типа.
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл.
 11. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
 12. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
 13. Вортекс.
 14. Автоматические дозаторы переменного объема.
 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)), «ДТ-96» / «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01250, РУ № ФСР 2011/10229)), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399)).
 16. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 17. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
 18. Емкость для сброса наконечников.

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 (K₂ЭДТА или K₃ЭДТА) 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 ДНК 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:

Форма 3: **REF** R-V1-G(1-4)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0253-1-3;

Форма 6: **REF** R-V1-G(1-6)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0256-1-3 / **VER** 20.05.24 / стр. 12 из 30

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 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 1 суток.

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), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО, 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 биологическом материале (плазма крови), используемом для исследования (см. табл. 7).

Были протестированы:

- образец биологического материала, содержащий смесь *HCV* различных генотипов с концентрацией РНК *HCV* каждого из них 1×10^4 МЕ/мл;
- образцы плазмы крови с добавлением эндогенных потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 7;
- образцы плазмы крови, полученные из цельной крови, забранной в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- образцы плазмы крови, полученные из цельной крови, забранной в пробирки с K_2 ЭДТА и K_3 ЭДТА в качестве антикоагулянтов;
- образцы плазмы крови, полученные от пациента с вирусом гепатита С с подавленной вирусной нагрузкой, находящегося на специфической терапии, включающей в себя пэгинтерферон (PegIFN) и рибавирин (RBV) (подтверждение неопределяемой вирусной нагрузки *HCV* в образце проводили с помощью набора реагентов «АмплиСенс® *HCV/ HBV/ HIV-FL*» (РУ № ФСР 2009/06187). Плазма от пациента исследовалась как отдельно, так и в смеси с контрольным образцом *HCV*, в котором концентрация РНК *HCV* каждого генотипа идентична контрольному образцу *HCV* (10^4 МЕ/мл).

Таблица 7

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент (протестированная концентрация в образце)	Наличие интерференции
Плазма крови	Эндогенные вещества	Гемоглобин (5 г/л)	Не обнаружено
		Триглицериды (37 ммоль/л)	Не обнаружено
		Билирубин (210 мкмоль/л)	Не обнаружено
		Белок (120 г/л)	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	K_2 ЭДТА (2 мг/мл) ²	Не обнаружено
		K_3 ЭДТА (2 мг/мл) ²	Не обнаружено
		Лития гепарин (12 МЕ/мл) ²	<u>Обнаружено</u>
		Пэгинтерферон (1,5 мкг/кг/нед) + рибавирин (15 мкг/кг/сут)	Не обнаружено

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

Форма 3: **REF** R-V1-G(1-4)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0253-1-3;

Форма 6: **REF** R-V1-G(1-6)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0256-1-3 / **VER** 20.05.24 / стр. 14 из 30

СОСТАВ

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-4 – комплект реагентов для амплификации участков кДНК генотипов (1a, 1b, 2, 3a, 4) *HCV* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FRT <i>HCV</i> генотипы 1b/3a	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FRT <i>HCV</i> генотипы 1a/2	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FRT <i>HCV</i> ВКО/генотип 4	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	3 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	3 пробирки
ПКО кДНК <i>HCV</i> генотипы 1b/3a	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО кДНК <i>HCV</i> генотипы 1a/2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО кДНК <i>HCV</i> ВКО/генотип 4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-248-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов входит в состав формы 3.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-6 – комплект реагентов для амплификации участков кДНК генотипов (1a, 1b, 2, 3a, 4, 5a, 6) *HCV* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FRT <i>HCV</i> генотипы 1b/3a	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FRT <i>HCV</i> генотипы 1a/2	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FRT <i>HCV</i> ВКО/генотип 4	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FRT <i>HCV</i> генотипы 5a/6	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	4 пробирки
ПКО кДНК <i>HCV</i> генотипы 1b/3a	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО кДНК <i>HCV</i> генотипы 1a/2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО кДНК <i>HCV</i> ВКО/генотип 4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО кДНК <i>HCV</i> генотипы 5a/6	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-248-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов входит в состав формы 6.

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК,
- амплификация кДНК 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 стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

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

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

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО STI-248-rec**.

Объем ВКО STI-248-rec – **10 мкл** в каждую пробирку **ВНИМАНИЕ!** Объем ВКО отличается от указанного в инструкции к комплекту реагентов «РИБО-сорб».

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

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

Объем элюции – **50 мкл**.

ВНИМАНИЕ! Реакцию ОТ рекомендуется проводить сразу после получения проб РНК.

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 РНК

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

Для получения кДНК на матрице РНК используется комплект реагентов «РЕВЕРТА-L». Порядок работы с комплектом реагентов «РЕВЕРТА-L» смотрите в инструкции к комплекту реагентов для получения кДНК на матрице РНК.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

A1. Подготовка проб для амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-g1-4

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления трех реакционных смесей. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT HCV генотипы 1b/3a** или **ПЦР-смеси-1-FRT HCV генотипы 1a/2**, или **ПЦР-смеси-1-FRT HCV ВКО/генотип 4**, **5 мкл ПЦР-буфера-С** и **0,5 мкл полимеразы (TaqF)**. Смеси готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на одну реакцию.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирки с **ПЦР-смесью-1-FRT HCV генотипы 1b/3a**, **ПЦР-смесью-1-FRT HCV генотипы 1a/2** и **ПЦР-смесью-1-FRT HCV ВКО/генотип 4**. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В трех отдельных пробирках подготовить три реакционные смеси:

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

- в первой пробирке, промаркированной «1b/3a», смешать необходимое количество ПЦР-смеси-1-FRT *HCV* генотипы 1b/3a, полимеразы (TaqF), ПЦР-буфера-С;
- во второй пробирке, промаркированной «1a/2», смешать необходимое количество ПЦР-смеси-1-FRT *HCV* генотипы 1a/2, полимеразы (TaqF), ПЦР-буфера-С;
- в третьей пробирке, промаркированной «ВКО/4» смешать необходимое количество ПЦР-смеси-1-FRT *HCV* ВКО/генотип 4, полимеразы (TaqF), ПЦР-буфера-С.

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

4. Отобрать необходимое (трехкратное) количество пробирок или стрипов для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб (см. табл. 8). Промаркировать пробирки «1b/3a», «1a/2» и «ВКО/4».
5. Внести в каждую пробирку первого ряда по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси «1b/3a», в каждую пробирку второго ряда - по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси «1a/2», в каждую пробирку третьего ряда - по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси «ВКО/4». Неиспользованные остатки реакционных смесей выбросить.
6. В каждые три пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл кДНК-проб**, полученных в результате экстракции и обратной транскрипции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ПЦР (K+_{1b/3a})** – в пробирку с реакционной смесью «1b/3a» внести **10 мкл ПКО кДНК *HCV* генотипы 1b/3a**;
 - б) **положительный контроль ПЦР (K+_{1a/2})** – в пробирку с реакционной смесью «1a/2» внести **10 мкл ПКО кДНК *HCV* генотипы 1a/2**;
 - в) **положительный контроль ПЦР (K+_{ВКО/4})** – в пробирку с реакционной смесью «ВКО/4» внести **10 мкл ПКО кДНК *HCV* ВКО/генотип 4**.
 - г) **отрицательный контроль ПЦР (K–)** – в три пробирки с различными реакционными смесями «1b/3a», «1a/2» и

Форма 3: **REF** R-V1-G(1-4)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0253-1-3;

Форма 6: **REF** R-V1-G(1-6)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0256-1-3 / **VER** 20.05.24 / стр. 19 из 30

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

«ВКО/4» внести по 10 мкл К–.

- д) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в три пробирки с различными реакционными смесями «1b/3a», «1a/2» и «ВКО/4» внести по 10 мкл пробы, экстрагированной из **ОКО** и прошедшей обратную транскрипцию.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок с добавленными контрольными образцами необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

Таблица 8

Схема приготовления одной реакционной смеси

		Объем реагентов на указанное количество реакций		
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,50
Число исследуемых образцов	Число реакций ³	ПЦР-смесь-1-FRT*	ПЦР-буфер-С	Полимераза (TaqF)
4	8	80	40	4,0
5	9	90	45	4,5
6	10	100	50	5,0
7	11	110	55	5,5
8	12	120	60	6,0
9	13	130	65	6,5
10	14	140	70	7,0
11	15	150	75	7,5
12	16	160	80	8,0

* Наименование ПЦР-смеси-1-FRT

A2. Подготовка проб для амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-g1-6

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления четырех реакционных смесей. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT HCV генотипы 1b/3a** или **ПЦР-смеси-1-FRT HCV генотипы 1a/2**, или **ПЦР-смеси-1-FRT HCV ВКО/генотип 4**, или **ПЦР-смеси-1-FRT HCV генотипы 5a/6**, **5 мкл ПЦР-буфера-С** и **0,5 мкл полимеразы (TaqF)**. Смесей готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на одну реакцию.

³ Число исследуемых образцов + 1 контроль этапа экстракции РНК + 2 контроля ПЦР + запас на один образец (N+4, N – количество исследуемых образцов).

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирки с ПЦР-смесью-1-FRT *HCV* генотипы 1b/3a, ПЦР-смесью-1-FRT *HCV* генотипы 1a/2, ПЦР-смесью-1-FRT *HCV* ВКО/генотип 4 и ПЦР-смесью-1-FRT *HCV* генотипы 5a/6. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В четырех отдельных пробирках подготовить четыре реакционные смеси:
 - в первой пробирке, промаркированной «1b/3a», смешать необходимое количество ПЦР-смеси-1-FRT *HCV* генотипы 1b/3a, полимеразы (TaqF), ПЦР-буфера-С;
 - во второй пробирке, промаркированной «1a/2», смешать необходимо количество ПЦР-смеси-1-FRT *HCV* генотипы 1a/2, полимеразы (TaqF), ПЦР-буфера-С;
 - в третьей пробирке, промаркированной «ВКО/4» смешать необходимо количество ПЦР-смеси-1-FRT *HCV* ВКО/генотип 4, полимеразы (TaqF), ПЦР-буфера-С;
 - в четвертой пробирке, промаркированной «5a/6» смешать необходимо количество ПЦР-смеси-1-FRT *HCV* генотипы 5a/6, полимеразы (TaqF), ПЦР-буфера-С.

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

4. Отобрать необходимое (четырекратное) количество пробирок или стрипов для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб (см. табл. 9). Промаркировать пробирки «1b/3a», «1a/2», «ВКО/4» и «5a/6».
5. Внести в каждую пробирку первого ряда по 15 мкл приготовленной реакционной смеси «1b/3a», в каждую пробирку второго ряда по - 15 мкл приготовленной реакционной смеси «1a/2», в каждую пробирку третьего ряда - по 15 мкл приготовленной реакционной смеси «ВКО/4», в каждую пробирку четвертого ряда - по 15 мкл приготовленной реакционной смеси «5a/6». Неиспользованные остатки реакционных смесей выбросить.

Схема приготовления одной реакционной смеси

		Объем реагентов на указанное количество реакций		
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,50
Число исследуемых образцов	Число реакций ⁴	ПЦР-смесь-1-FRT*	ПЦР-буфер-С	Полимераза (TaqF)
4	8	80	40	4,0
5	9	90	45	4,5
6	10	100	50	5,0
7	11	110	55	5,5
8	12	120	60	6,0
9	13	130	65	6,5
10	14	140	70	7,0
11	15	150	75	7,5
12	16	160	80	8,0

* Наименование ПЦР-смеси-1-FRT

6. В каждые четыре пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл кДНК-проб**, полученных в результате экстракции и обратной транскрипции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ПЦР (K+_{1b/3a})** – в пробирку с реакционной смесью «1b/3a» внести **10 мкл ПКО кДНК HCV** генотипы **1b/3a**;
 - б) **положительный контроль ПЦР (K+_{1a/2})** – в пробирку с реакционной смесью «1a/2» внести **10 мкл ПКО кДНК HCV** генотипы **1a/2**;
 - в) **положительный контроль ПЦР (K+_{ВКО/4})** – в пробирку с реакционной смесью «ВКО/4» внести **10 мкл ПКО кДНК HCV ВКО/генотип 4**;
 - г) **положительный контроль ПЦР (K+_{5a/6})** – в пробирку с реакционной смесью «5a/6» внести **10 мкл ПКО кДНК HCV** генотипы **5a/6**.
 - д) **отрицательный контроль ПЦР (K–)** – в четыре пробирки с различными реакционными смесями «1b/3a», «1a/2», «ВКО/4» и «5a/6» внести по **10 мкл K–**.
 - е) **отрицательный контроль экстракции (OK)** – в четыре пробирки с различными реакционными смесями «1b/3a»,

⁴ Число исследуемых образцов + 1 контроль этапа экстракции РНК + 2 контроля ПЦР + запас на один образец (N+4, N – количество исследуемых образцов).

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

«1а/2», «ВКО/4» и «5а/6» внести по 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО и прошедшей обратную транскрипцию.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок с добавленными контрольными образцами необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

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. 10, 11).

Таблица 10

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа⁵

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. Темп-ры	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	–	

Таблица 11

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа⁶

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, HEX	
	72	15 с	–	

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в

⁵ Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research), Rotor-Gene Q (Qiagen).

⁶ Например, «ДТ-96» / «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), CFX96 (Bio-Rad).

Форма 3: **REF** R-V1-G(1-4)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0253-1-3;

Форма 6: **REF** R-V1-G(1-6)-2x(RG,iQ,Mx,Dt,SC); **REF** H-0256-1-3 / **VER** 20.05.24 / стр. 23 из 30

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

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 в соответствии с таблицей 12:

Таблица 12

Наименование ПЦР-смеси-1-FRT	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
<i>HCV</i> генотипы 1b/3a	кДНК <i>HCV</i> генотип 1b	кДНК <i>HCV</i> генотип 3a
<i>HCV</i> генотипы 1a/2	кДНК <i>HCV</i> генотип 1a	кДНК <i>HCV</i> генотип 2
<i>HCV</i> ВКО/генотип 4	кДНК ВКО	кДНК <i>HCV</i> генотип 4
<i>HCV</i> генотипы 5a/6 ⁷	кДНК <i>HCV</i> генотип 5a	кДНК <i>HCV</i> генотип 6

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

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

Принцип интерпретации результатов следующий:

1. Генотип *HCV* устанавливается путём сопоставления результатов амплификации в трёх (для «ПЦР-комплекта» вариант FRT-g1-4) или четырех пробирках (для «ПЦР-комплекта» вариант FRT-g1-6) в соответствии с табл. 12, причем:

⁷ Входит в состав «ПЦР-комплекта» вариант FRT-g1-6.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

- а) Если для пробы определено значение C_t , соответствующее одному генотипу РНК *HCV*, то выдается наименование выявленного генотипа;
- б) Если для пробы определены два и более значений C_t , то выдается двойной, тройной и т.д. генотип.

Примечание - Если для пробы определены значения C_t на реакционной смеси «ВКО/4» по каналу для флуорофора JOE (4 генотип *HCV*) и на реакционной смеси «1b/3a» по каналу для флуорофора FAM (1b генотип *HCV*), причем значение C_t по 4-му генотипу меньше значения C_t по первому генотипу на 10 и более циклов, то выдается результат **«Генотип 4»**.

2. Если для пробы определено значение C_t только для ВКО (реакционная смесь «ВКО/4», канал для флуорофора FAM) и оно ниже граничного значения, то выдается результат **«Генотип *HCV* не определен»**. При этом если известно, что концентрация РНК *HCV* в этой пробе находится в пределах аналитической чувствительности (предела обнаружения) набора реагентов, выдается результат **«Генотип *HCV* не определен по причине низкой вирусной нагрузки»**.
3. Если для пробы отсутствуют значения C_t по всем генотипам, а значение C_t для ВКО (по каналу для флуорофора FAM на ПЦР-смеси-1-FRT *HCV* ВКО/генотип 4) не определено или превышает граничное, то результат анализа считается **невалидным** и требуется повторить ПЦР-исследование данной пробы, начиная с этапа экстракции РНК.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей ПЦР в соответствии с табл. 13 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Реакционная смесь	«1b/3a»		«1a/2»		«ВКО/4»		«5a/6» ⁸	
Контроль	Значения порогового цикла (Ct) для флуорофора							
	FAM	JOE	FAM	JOE	FAM	JOE	FAM	JOE
OK	Отсутствует		Отсутствует		<u>Меньше</u> граничного значения	Отсутствует	Отсутствует	
K-	Отсутствует		Отсутствует		Отсутствует		Отсутствует	
K+ _{1b/3a}	<u>Меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения	*	*	*	*	*	*
K+ _{1a/2}	*	*	<u>Меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения	*	*	*	*
K+ _{ВКО/4}	*	*	*	*	<u>Меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения	*	*
K+ _{5a/6}	*	*	*	*	*	*	<u>Меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения

* На данной реакционной смеси не тестируется.

Возможные ошибки:

1. Для положительных контролей ПЦР (K+_{1b/3a}, K+_{1a/2}, K+_{ВКО/4} или K+_{5a/6}) значение порогового цикла (Ct) хотя бы в одной пробе по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. таблицу 12) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE хотя бы на одной из реакционных смесей «1b/3a», «1a/2», «5a/6» и/или на реакционной смеси «ВКО/4» 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. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для

⁸ Входит в состав ПЦР-комплекта вариант FRT-g1-6.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

которых на этой реакционной смеси был определен генотип *HCV*, начиная с этапа экстракции РНК.

3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE на любой реакционной смеси 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 амплификацию и детекцию для всех образцов, для которых на этой реакционной смеси был определен генотип *HCV*.

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 3. «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-4 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Допускается хранение ПЦР-смеси-1-FRT *HCV* генотипы 1b/3a, ПЦР-смеси-1-FRT *HCV* генотипы 1a/2, ПЦР-смесь-1-FRT *HCV* ВКО/генотип 4, ПКО кДНК *HCV* генотипы 1b/3a, ПКО кДНК *HCV* генотипы 1a/2 и ПКО кДНК *HCV* ВКО/генотип 4 при температуре ниже минус 24 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *HCV* генотипы 1b/3a, ПЦР-смесь-1-FRT *HCV* генотипы 1a/2 и ПЦР-смесь-1-FRT *HCV* ВКО/генотип 4 хранить в защищенном от света месте.

Форма 6. «ПЦР-комплект» вариант FRT-g1-6 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Допускается хранение ПЦР-смеси-1-FRT *HCV* генотипы 1b/3a, ПЦР-смеси-1-FRT *HCV* генотипы 1a/2, ПЦР-смесь-1-FRT *HCV* ВКО/генотип 4, ПЦР-смеси-1-FRT *HCV* генотипы 5a/6, ПКО кДНК *HCV* генотипы 1b/3a, ПКО кДНК *HCV* генотипы 1a/2, ПКО кДНК *HCV* ВКО/генотип 4 и ПКО кДНК *HCV* генотипы 5a/6 при температуре ниже минус 24 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *HCV* генотипы 1b/3a, ПЦР-смесь-1-FRT *HCV* генотипы 1a/2, ПЦР-смесь-1-FRT *HCV* ВКО/генотип 4 и ПЦР-смесь-1-FRT *HCV* генотипы 5a/6 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, д. 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 или к инструкции по применению в электронном виде
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Верхняя граница температурного диапазона		Дата изготовления
	Изготовитель		