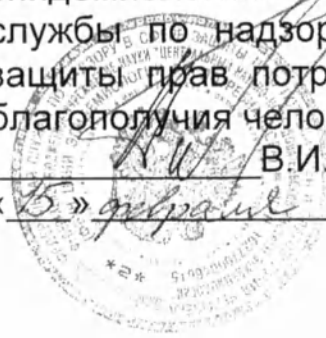


УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И. Покровский
« 5 » _____ 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК вируса гепатита G (HGV) в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® HGV-FL»

АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА....	9
ФОРМАТ FER.....	10
СОСТАВ.....	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	12
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	12
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ....	13
А. Подготовка пробирок для амплификации	13
Б. Проведение амплификации.....	16
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	16
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	17
ФОРМАТ FRT.....	19
СОСТАВ.....	19
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	21
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	21
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	22
А. подготовка пробирок для амплификации.....	22
Б. проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»...	24
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	26
СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	28
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- преп»	29
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	31

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	– внутренний контрольный образец
K+	– положительный контроль ПЦР
K–	– отрицательный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОТ	– обратная транскрипция
ПКО	– положительный контрольный образец
ПК	– положительный контроль экстракции
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
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
FEP	– флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
HBV	– вирус гепатита В
HCV	– вирус гепатита С
HDV	– вирус гепатита D («Дельта»)
HGV	– вирус гепатита G

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® HGV-FL» предназначен для выявления РНК вируса гепатита G (HGV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.¹

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из плазмы крови совместно с ВКО, проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «по конечной точке» (формат FEP) или в режиме «реального времени» (формат FRT). По каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ВКО. По каналу, соответствующему флуорофору JOE, детектируется продукт амплификации кДНК HGV. Положительный контрольный образец этапа экстракции ПКО HGV-FL-рес детектируется по каналам, соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE (HGV). Контрольный образец амплификации - ПКО кДНК HGV-FL - является комплексным для HGV и ВКО и аналогично детектируется по каналам, соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE (HGV).

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 форматах:

Формат FEP

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – 2 штуки, «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FEP-50 F.

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F.

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-50 F.

Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

● Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включая экстракцию РНК из клинического материала методом преципитации, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

● Формы комплектации 3 и 4 предназначены для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

● Форма комплектации 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – 2 штуки и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включая экстракцию РНК из клинического материала методом преципитации, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 3 и 4 предназначены для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Формат	Объем экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Аналитическая чувствительность, копий/мл
Формат FEP/ Формат FRT	100	«РИБО-преп», NucliSENS easyMAG	500
Формат FEP/ Формат FRT	1000	NucliSENS easyMAG	50

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной ДНК/РНК следующих организмов и вирусов: вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита D, вирус гепатита Е, вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса типы 1, 2, энтеровирус (Coxsackie B1, B2, B3, B4, B5, B6, Polio I, II, III), ротавирус человека WA, астровирус, вирус герпеса человека типы 6, 8, аденовирус типы 2, 3, 7, *Homo sapiens*.

Перекрестные реакции для указанных организмов и вирусов зарегистрированы не были.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и 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».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании

работы.

- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 1. Экстракция РНК из клинического материала

1. Ламинарный бокс.
2. Центрифуга/вортекс.
3. Автоматические дозаторы переменного объема.
4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
5. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл и до 1000 мкл.
6. Штативы для наконечников и пробирок объемом 1,5 мл.
7. Холодильник от 2 до 8 °С.
8. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
9. Емкость с дезинфицирующим раствором.

При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008):

1. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
2. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс г.
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
4. Одноразовые наконечники до 200 мкл.
5. Одноразовый флакон на 10-20 мл.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

1. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК (например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)).
2. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) (bioMérieux, Франция)).
3. Для автоматической станции, например NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция), требуется дополнительный комплект реагентов «ЕМ-плюс» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

ЗОНА 2. Проведение реакции обратной транскрипции, ПЦР и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
2. Центрифуга/вортекс.
3. Автоматические дозаторы переменного объема.
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл в штативах.
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
6. Холодильник от 2 до 8 °С.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость для сброса наконечников.

При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FEP:

9. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США), MaxyGene (Axygen, США) или аналогичные).
10. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия), «Джин» (версия п.о. не ниже 4.4i) («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).

При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT:

11. Программируемый амплификатор роторного типа (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия)) или амплификатор планшетного типа (например, iCycler iQ5 (BioRad, США), Mx3000P (Stratagene, США)) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.
12. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-100 F и FRT-50 F
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axygen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЗ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Для проведения ПЦР-исследования используется плазма (сыворотка) периферической крови. Для получения плазмы кровь отбирают в пробирку с 3 % раствором ЭДТА из расчета 20:1 (20 частей крови на 1 часть ЭДТА). Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g, после чего отбирают плазму и переносят в отдельную одноразовую пробирку. Для получения сыворотки пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 800-1600 g в течение 10 минут при комнатной температуре, после чего отбирают сыворотку и переносят в отдельную одноразовую пробирку. Хранить плазму (сыворотку) можно не более 3 дней при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 68 °С.

ФОРМАТ FEP

ФОРМАТ FEP

СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ²	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. В состав формы комплектации 1 входят 2 комплекта, в состав формы 2- 1 комплект.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса гепатита G (HGV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HGV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMiv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
ПКО кДНК HGV-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 112 реакций обратной транскрипции и

² При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FEP

амплификации, включая контроли.

Входит в состав форм комплектации 1 и 3.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО HGV-FL-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ВКО ICZ-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	4 пробирки

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-50 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса гепатита G (HGV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HGV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMiv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ПКО кДНК HGV-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

Входит в состав форм комплектации 2 и 4.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО HGV-FL-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ВКО ICZ-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	2 пробирки

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Проведение реакции обратной транскрипции и амплификации.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора:

- при использовании комплекта реагентов **«РИБО-преп»** порядок работы см. в **приложении 1** («Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»).

При использовании автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот компании BioMerieux совместно с набором реагентов необходимо использовать протоколы и реагенты, позволяющие проводить экстракцию РНК из образцов плазмы и сыворотки крови объемом от 0,1 мл до 1 мл.

Процедура экстракции проводится в соответствии с инструкцией к автоматической станции, а также с учетом следующих условий:

- а) Обязательным условием является внесение ВКО в образцы или лизирующий раствор в объёме 10 мкл на одну пробу до начала экстракции.
- б) При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК *HGV*, РНК *HDV*, РНК *HCV*, РНК *HGV*, ДНК *HBV*, РНК ВИЧ и *HCV*-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).
- в) Программируемый объем элюции – 50-60 мкл (допускается увеличение объема элюции до 100 мкл).
- г) При использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG (BioMerieux, Франция) обязательно использование дополнительного комплекта реагентов «ЕМ-плюс» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Допускается использование режимов лизиса в приборе (**On-board**) и вне прибора (**Off-board**).

- д) После окончания экстракции РНК, извлечь пробирки из прибора и провести реакцию ОТ-ПЦР. Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарат необходимо хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес или не выше минус 68 °С в течение года.

Также см. методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению наборов реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) «АмплиСенс® HCV-FL», РНК вируса гепатита D (HDV) «АмплиСенс® HDV-FL», РНК вируса гепатита G (HGV) «АмплиСенс® HGV-FL», ДНК вируса гепатита В (HBV) «АмплиСенс® HBV-FL».

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ

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

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. табл. 1).

1. До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации на 0,2 мл или на 0,5 мл с учетом количества исследуемых контрольных образцов (два контроля этапа экстракции, два контроля этапа амплификации) и двух пробирок «Фон». Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. **Для приготовления реакционной смеси в случае необходимости подготовки пробирок «Фон» необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать**

реагенты из расчета на 1 реакцию: **10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FL HGV**, **5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT** и **0,25 мкл RT-G-mix-2** (см. также табл. 1, пункт А).

Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

4. Добавить в две пробирки **«Фон»** по **15 мкл приготовленной смеси** (без полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv)) и по **10 мкл буфера для элюции**, перемешать пипетированием. Сверху раскапать по 1 капле **минерального масла для ПЦР**.

ВНИМАНИЕ! После проведения амплификации образцы **«Фон»** можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С и использовать многократно. Многократное использование пробирок **«Фон»** допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа ПЦР-пробирок.

5. В оставшуюся часть реакционной смеси добавить из расчета на 1 пробу **0,5 мкл полимеразы (TaqF)** и **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)** (см. также табл. 1, пункт А). Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

Количество добавляемых в реакционную смесь ферментов полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv), указанное в табл. 1, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок **«Фон»**.

6. **В случае повторного использования образцов «Фон»** необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать из расчета на 1 реакцию: **10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FL HGV**, **5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT**, **0,25 мкл RT-G-mix-2**, **0,5 мкл полимеразы (TaqF)** и **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)** (см. также табл. 1, пункт Б). Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

7. Внести в пробирки по **15 мкл** готовой реакционной смеси. Сверху раскапать по 1 капле **минерального масла для ПЦР**.

8. В готовые пробирки внести по **10 мкл РНК-проб**, выделенных из клинических образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении РНК-проб, выделенных с помощью автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

9. Поставить **контрольные реакции**:

а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-**

пробы, выделенной из образца ПКО HGV-FL-rec.

- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку 10 мкл РНК-пробы, выделенной из образца ОКО.
- в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку 10 мкл буфера для элюции.
- г) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку 10 мкл ПКО кДНК HGV-FL.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Таблица 1

Схема приготовления реакционных смесей для формата FEP

А. Если пробирки «ФОН» готовятся

		Этап 1. Смесь из трех компонентов. Объем реактивов на указанное кол-во образцов с учетом контрольных точек и 2 образцов «Фон» (без TaqF и MMiv)			Этап 2. Внесение ферментов. Кол-во добавляемых ферментов на указанное кол-во образцов после отбора смеси на 2 образца «Фон» (мкл)	
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Число клинических образцов	Число исследуемых точек ³	ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HGV	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMiv)
6	10	120	60	3,0	5,0	2,5
10 ⁴	14	160	80	4,0	7,0	3,5
22 ⁵	26	280	140	7,0	13,0	6,5
34	38	400	200	10,0	19,0	9,5
46	50	520	260	13,0	25,0	12,5

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемых полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMiv) рассчитано за вычетом двух пробирок «Фон».

³ Число клинических образцов + 2 контроля этапа экстракции РНК + 2 контроля ОТ-ПЦР, (N+4, N - количество клинических образцов)

⁴ Панель из 12 пробирок на экстракцию

⁵ Панель из 24 пробирок на экстракцию

Б. Если используются ранее приготовленные пробирки «ФОН»⁶

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Число клинических образцов	Число исследуемых точек	ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HGV	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Реввертаза (MMiv)
6	10	100	50	2,5	5,0	2,5
10	14	140	70	3,5	7,0	3,5
22	26	260	130	6,5	13,0	6,5
34	38	380	190	9,5	19,0	9,5
46	50	500	250	12,5	25,0	12,5

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу амплификации (см. табл. 2). Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и запустить выполнение программы.

Таблица 2

Программа амплификации

Для амплификаторов с активным регулированием ⁷				Для амплификаторов с матричным регулированием ⁸			
Цикл	Температура, °C	Время	Циклов	Цикл	Температура, °C	Время	Циклов
1	50	30 мин	1	1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1	2	95	15 мин	1
3	95	2 с	45	3	95	10 с	45
	60	10 с			60	15 с	
					72	15 с	
4	10	Хранение		4	10	Хранение	

2. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к соответствующему прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации кДНК ВКО.

⁶ Допускается повторное исследование пробирок «ФОН» при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа ПЦР-пробирок

⁷ Например, «Терцик» («ДНК-Технология»), Gradient Palm Cyclер (Corbett Research), MaxyGene (Axygen), GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), SuperCycler Gradient Cyclер (Kyratex) и аналогичные.

⁸ Например, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) PTC-100 (MJ Research), T-personal (Biometra) и аналогичные.

- по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации кДНК *HGV*.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к ПЦР-комплекту, а также методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению наборов реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (*HCV*) «АмплиСенс® *HCV-FL*», РНК вируса гепатита D (*HDV*) «АмплиСенс® *HDV-FL*», РНК вируса гепатита G (*HGV*) «АмплиСенс® *HGV-FL*», ДНК вируса гепатита В (*HBV*) «АмплиСенс® *HBV-FL*».

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и РНК-проб, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора. Принцип интерпретации результатов следующий:

- значения менее установленного порогового значения отрицательного результата принимаются **отрицательными**, более установленного порогового значения положительного результата – **положительными**, между порогами – **сомнительными**.
- положительный результат по каналу HEX свидетельствует о **наличии в пробе РНК *HGV***.
- результат анализа **невалидный**, если для данной пробы сигнал по каналу FAM ниже установленного порогового значения отрицательного результата и сигнал по каналу HEX ниже установленного порогового значения.
- при получении сомнительного результата детекции требуется повторное проведение ПЦР-исследования данной пробы.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты прохождения положительных и отрицательных контролей в соответствии с табл. 3.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		Обозначение результата в программах некоторых детекторов
		FAM	HEX	
ОК	Экстракция РНК, ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	«–» или «ОК»
ПК	Экстракция РНК, ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	«+» или «ОК»
К+	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	«+» или «ОК»
К–	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	«нд» или «ОК»

Примечание – Пороговые значения указаны во вкладыше к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля экстракции (ПК) или положительного контроля ПЦР (К+) по каналу HEX получен сигнал ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых не обнаружена РНК *HGV*, начиная с этапа экстракции РНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) сигнал по каналу HEX выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК *HGV*, начиная с этапа экстракции РНК.

ФОРМАТ FRT

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ⁹	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. В состав формы комплектации 1 входят 2 комплекта, в состав формы 2 – 1 комплект.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса гепатита G (HGV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HGV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMiv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
ПКО кДНК HGV-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 112 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

Входит в состав форм комплектации 1 и 3.

⁹ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО HGV-FL-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ВКО ICZ-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	4 пробирки

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса гепатита G (HGV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HGV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ПКО кДНК HGV-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

Входит в состав форм комплектации 2 и 4.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО HGV-FL-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ВКО ICZ-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	2 пробирки

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Проведение реакции обратной транскрипции и амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому набору:

- при использовании комплекта реагентов **«РИБО-преп»** порядок работы см. в **приложении 1** «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»».

При использовании автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот компании BioMeriex совместно с набором реагентов необходимо использовать протоколы и реагенты, позволяющие проводить экстракцию РНК из образцов плазмы и сыворотки крови объемом от 0,1 мл до 1,0 мл.

Процедура экстракции проводится в соответствии с инструкцией к автоматическим станциям, а также с учетом следующих условий:

- а) Обязательным условием является внесение ВКО в образцы или лизирующий раствор в объеме 10 мкл на одну пробу до начала экстракции.
- б) При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК *HGV*, РНК *HDV*, РНК *HCV*, ДНК *HBV*, РНК ВИЧ и *HCV*-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).
- в) Программируемый объем элюции – 50-60 мкл (допускается увеличение объема элюции до 100 мкл).
- г) При использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG (BioMeriex, Франция) обязательно использование дополнительного комплекта реагентов «ЕМ-плюс» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Допускается использование режимов лизиса в приборе (**On-board**) и вне

прибора (**Off-board**).

- д) После окончания экстракции РНК, извлечь пробирки из прибора и провести реакцию ОТ-ПЦР. Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарат необходимо хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес или не выше минус 68 °С в течение года.

Также см. методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению наборов реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) «АмплиСенс® HCV-FL», РНК вируса гепатита D (HDV) «АмплиСенс® HDV-FL», РНК вируса гепатита G (HGV) «АмплиСенс® HGV-FL», ДНК вируса гепатита В (HBV) «АмплиСенс® HBV-FL».

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. табл. 4).

1. До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с учетом количества исследуемых контрольных образцов (два контроля экстракции, два контроля амплификации). Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.

3. Для приготовления реакционной смеси необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать реагенты из расчета на 1 реакцию: **10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FL HGV**, **5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT**, **0,25 мкл RT-G-mix-2**, **0,5 мкл полимеразы (TaqF)** и **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
4. Внести в пробирки по **15 мкл** готовой реакционной смеси.
5. В готовые пробирки внести по **10 мкл РНК-проб**, выделенных из клинических образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении РНК-проб, выделенных с помощью автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

6. Поставить **контрольные реакции**:
 - а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-пробы**, выделенной из образца ПКО HGV-FL-рес.
 - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-пробы**, выделенной из образца ОКО.
 - в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл буфера для элюции**.
 - г) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК HGV-FL**.

Схема приготовления реакционных смесей для формата FRT

		Объем реактивов				
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Число клинических образцов	Число исследуемых точек ¹⁰	ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HGV	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
4	8	80	40	2,0	4,0	2,0
6 ¹¹	10	100	50	2,5	5,0	2,5
8	12	120	60	3,0	6,0	3,0
10 ¹²	14	140	70	3,5	7,0	3,5
12	16	160	80	4,0	8,0	4,0
14 ¹³	18	180	90	4,5	9,0	4,5
16	20	200	100	5,0	10,0	5,0
18	22	220	110	5,5	11,0	5,5
20	24	240	120	6,0	12,0	6,0
22 ¹⁴	26	260	130	6,5	13,0	6,5
34	38	380	190	9,5	19,0	9,5
46	50	500	250	12,5	25,0	12,5

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

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
2. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 5, 6).

¹⁰ Число клинических образцов + 2 контроля этапа экстракции РНК + 2 контроля ОТ-ПЦР, (N+4, N - количество клинических образцов)

¹¹ Экстракция одного стрипа на приборе NucliSENS easyMAG (8 пробирок)

¹² Панель из 12 пробирок на экстракцию

¹³ Экстракция двух стрипов на приборе NucliSENS easyMAG (16 пробирок)

¹⁴ Панель из 24 пробирок на экстракцию, экстракция трех стрипов на приборе NucliSENS easyMAG.

Таблица 5

Программа «АмплиСенс-2 RG» для приборов роторного типа¹⁵

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. Темп-ры	50	15 мин	—	1
Hold/Удерж. Темп-ры	95	15 мин	—	1
Cycling/ Циклирование	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 ROX/Orange Cy5/Red	
	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*, *HCV*, *HDV*, генотипирования *HCV* и др.).

Примечание. Каналы ROX/Orange и Cy5/Red включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

Таблица 6

Программа «АмплиСенс-2 iQ» для приборов планшетного типа¹⁶

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество 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, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	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*, *HBV*, *HCV*, *HDV*, генотипирования *HCV* и др.).

Примечание – Каналы ROX и Cy5 включаются при необходимости, если проводятся

¹⁵ Например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия), RotorGene Q (Qiagen, Германия)

¹⁶ Например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Мх3000Р (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

тесты в формате «мультиплекс», для которых используются эти каналы.

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

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу для флуорофора FAM (или аналогичного) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации кДНК ВКО;
- по каналу для флуорофора JOE (или аналогичного) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК HGV.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы РНК значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов.

Результат амплификации по каналу считается *положительным*, если кривая однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, *отрицательным* в случае отсутствия пересечения кривой с пороговой линией (нет значения C_t или C_p) и *сомнительным* во всех других случаях.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- образец считается **положительным** по содержанию РНК HGV, если на канале JOE/HEX/Yellow получено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение.
- образец считается **отрицательным** по содержанию РНК HGV, если на канале JOE/HEX/Yellow отсутствует значение C_t или получено значение C_t более указанного граничного значения, а по каналу ВКО для него определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение.
- образец считается **сомнительным** в случае получения сомнительного результата по любому из каналов. Рекомендуется повторное ПЦР-исследование соответствующего образца.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше к ПЦР-комплекту. См. также инструкции к соответствующим приборам для ПЦР в режиме «реального

времени» и методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению наборов реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) «АмплиСенс® HCV-FL», РНК вируса гепатита D (HDV) «АмплиСенс® HDV-FL», ДНК вируса гепатита В (HBV) «АмплиСенс® HBV-FL» и РНК вируса гепатита G (HGV) «АмплиСенс® HGV-FL».

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты прохождения контрольных образцов в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 7).

Таблица 7

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результат амплификации по каналу	
		FAM/Green	JOE/HEX/Yellow
ОК	Экстракция РНК, ПЦР	Ниже граничного значения	Отсутствует значение <i>Ct</i>
ПК	Экстракция РНК, ПЦР	Ниже граничного значения	Ниже граничного значения
К+	ПЦР	Ниже граничного значения	Ниже граничного значения
К–	ПЦР	Отсутствует значение <i>Ct</i>	Отсутствует значение <i>Ct</i>

Примечание – Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля экстракции (ПК) или положительного контроля ПЦР (К+) по каналу JOE/HEX/Yellow значение *Ct* отсутствует или превышает указанное (граничное) значение, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых не обнаружена РНК HGV, начиная с этапа экстракции РНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналу JOE/HEX/Yellow получено значение *Ct*, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК HGV, 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. При получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С. «ПЦР-комплект» хранить при температуре не выше минус 16 °С. Не допускается замораживание/оттаивание ПКО кДНК HGV-FL, ПКО HGV-FL-rec и ВКО ICZ-rec более двух раз. После размораживания ПКО кДНК HGV-FL, ПКО HGV-FL-rec и ВКО ICZ-rec и буфер для элюции хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 месяцев. ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HGV хранить в защищенном от света месте.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® HGV-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)¹⁷.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Управления делами Президента Российской Федерации

Е.Л. Никонов



¹⁷ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»

Порядок работы

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре до 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Промаркировать пробирки.
3. На дно каждой пробирки внести по **10 мкл ВКО ICZ-rec**.

4. В пробирки внести по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.

Примечание – При большом объеме образцов для облегчения процедуры экстракции допускается смешивание в отдельном стерильном флаконе **раствора для лизиса и ВКО** (из расчета на один образец 300 мкл раствора для лизиса и 10 мкл ВКО) с последующим разнесением по **300 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл.

При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК *HGV* РНК, *HDV*, РНК *HCV*, ДНК *HBV*, РНК ВИЧ и *HCV*-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

5. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя одноразовые наконечники с фильтрами. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить на центрифуге для сброса капель жидкости с крышки.
6. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль экстракции (ПК)**. Для этого в пробирку с раствором для лизиса добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПК О HGV-FL-rec**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль экстракции (ОК)**. Для этого в пробирку с раствором для лизиса добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
8. Содержимое пробирок прогреть **5 мин при 65°C** в термостате, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
9. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
10. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 5 мин** на микроцентрифуге.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

11. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
13. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
15. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
16. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
17. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
18. Поместить пробирки в термостат при температуре **65°C на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
19. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65°C на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
20. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °C. Для длительного хранения препарат необходимо хранить при температуре не выше минус 16 °C в течение 1 мес, или не выше минус 68 °C в течение года.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации



Код партии



Максимальное
число тестов



Изделие для in vitro
диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Ограничение
температуры



Не допускать
попадания
солнечного света



Верхнее ограничение
температуры



Дата изготовления



Производитель

«УТВЕРЖДАЮ»:

Главный врач ФГБУ

«Поликлиника № 1» Управления
делами Президента Российской
Федерации


Е.М.Никонов

«15» декабря 2012 г.

**Отзыв на изменения в технических условиях (ТУ 9398-186-01897593-
2012) и инструкции по применению набора реагентов**

для выявления РНК вируса гепатита G (*HGV*) в клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-
флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *HGV*-FL»

В ходе экспертного изучения внесенных изменений в ТУ 9398-186-01897593-2012 и инструкцию по применению ранее зарегистрированного набора реагентов «АмплиСенс® *HGV*-FL» (РУ ФСР № 2011/12673 от 22 декабря 2011 г.) было установлено следующее:

Внесенные изменения носят формальный характер и обусловлены изменением названия института с ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора на ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, вследствие чего:

- переоформлены титульные страницы ТУ и инструкции;
- по тексту ТУ и инструкции изменено название института;
- в инструкции по применению на титульной странице добавлены зарегистрированный товарный знак, символы производителя и символ изделия для «in vitro диагностики» (IVD);

Кроме того, в инструкцию по применению внесены некоторые формальные изменения, которые носят уточняющий характер:

- согласно Регистрационному удостоверению (РУ) и техническим условиям (ТУ) в инструкцию добавлена оптовая форма комплектации;

- добавлен номер ТУ для комплекта реагентов «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008)

- в разделе «Меры предосторожности» старые санитарные правила 1999 года заменены на санитарные правила 2010 года;

- в разделе «Срок годности, условия транспортирования и хранения» с целью уточнения добавлены фразы «Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное» и уточнены условия хранения комплекта реагентов «РИБО-преп»;

- на последней странице инструкции добавлен раздел «Символы, используемые в печатной продукции» с целью облегчения работы с инструкцией;

- уточнен адрес для направления рекламаций.

В остальном инструкция не изменилась: в полном объеме представлены сведения о назначении, принципе метода, составе набора, мерах предосторожности, взятии, транспортировке и хранении исследуемого материала для проведения исследований, оборудовании и материалах, используемых в подготовке и проведении анализа. Подробно и четко без изменений изложена процедура проведения анализа, регистрации и учета результатов. С незначительными уточнениями указаны условия хранения набора. В конце также осталось одно приложение, в котором указаны разные виды экстракции ДНК/РНК выделительными комплектами, которые тоже не потерпели никаких изменений по сравнению с ранее зарегистрированной инструкцией.

ТУ 9398-186-01897593-2012 полностью аналогичны ТУ 9398-186-01897593-2011, за исключением названия института.

Аналитические и диагностические характеристики набора, отражающие его чувствительность и специфичность, остались прежние, также как приборная база, для которой был разработан этот набор.

Заключение. Внесенные изменения в ТУ и инструкцию по применению набора носят формальный, уточняющий характер и не требуют проведения технических и медицинских испытаний.

Заведующий КДЛ

ФГБУ «Поликлиника № 1» Управления делами

Президента Российской Федерации

к.м.н., профессор



Кудрявцева Л.В.

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 3 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора


В.В.Малеев