

УТВЕРЖДАЮ

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

В.В.Малеев
«___» _____ 2016 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления и дифференциации генотипов (1a, 1b, 2, 3a)

вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

с электрофоретической детекцией продуктов амплификации

в агарозном геле

«АмплиСенс® HCV-генотип-EPH»

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
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	10
СОСТАВ.....	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	13
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	13
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ.....	13
I. Проведение реакции обратной транскрипции	13
А. Подготовка пробирок для обратной транскрипции	13
Б. Проведение реакции обратной транскрипции	15
II. Проведение амплификации.....	15
А. Подготовка пробирок для амплификации	15
Б. Проведение амплификации	16
ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	17
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	18
СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	20
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	20
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- сорб»	22
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле с использованием комплекта реагентов «ЭФ» вариант генотип-200	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	26

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	– комплиментарная ДНК
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ОТ	– обратная транскрипция
ПКО	– положительный контрольный образец
п.н.	– пар нуклеотидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
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
HCV	– вирус гепатита С

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® HCV-генотип-EPh» предназначен для выявления и дифференциации генотипов 1a, 1b, 2, 3a вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

Данный набор реагентов рекомендуется использовать после обнаружения РНК HCV в исследуемых образцах с помощью наборов реагентов, предназначенных как для качественного, так и для количественного определения РНК вируса гепатита С (например, «АмплиСенс® HCV-FL», использующего гибридизационно-флуоресцентную детекцию, или «АмплиСенс® HCV-EPh», использующего электрофоретическую детекцию продуктов амплификации (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)). В случае если проводился количественный анализ исследуемых образцов, набор реагентов рекомендуется использовать для образцов с концентрацией вируса HCV более 10^4 МЕ/мл.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из плазмы крови, проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

Определение генотипа HCV для одного образца проводится в двух пробирках, в первой пробирке дифференцируются генотипы 1a и 1b HCV, во второй пробирке –

генотипы 2 и 3a *HCV*.

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,5 мл), «ЭФ» вариант генотип-200.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,2 мл), «ЭФ» вариант генотип-200.

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,5 мл).

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,2 мл).

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификацию кДНК *HCV* с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

Формы комплектации 3 и 4 предназначены для проведения амплификации кДНК *HCV*. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов «РИБО-сорб», «РЕВЕРТА-L» и «ЭФ» вариант генотип 200 производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Объём выделения, мкл	Комплект для выделения РНК/ДНК	Аналитическая чувствительность, МЕ/мл
100	«РИБО-сорб»	$1,0 \times 10^4$

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов показала отсутствие перекрестных реакций на генотипы 1, 2, 3 вируса гепатита С, вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита D, вирус гепатита Е, вирус гепатита G, вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса 1 и 2 типов, вирус герпеса человека 6 и 8 типов, ДНК человека.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических 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 необходимо всегда выполнять следующие требования:

- 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, 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 Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы,

оборудование и реагенты в Зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты (включая буфер и гели), упаковку², биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями 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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром³. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- При работе с включенным трансиллюминатором пользоваться защитным экраном или защитной маской.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

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

³ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- 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.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, не включающих комплекты реагентов «РИБО-сорб», «ЭФ»).

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, включающих комплекты реагентов «РИБО-сорб», «ЭФ»).

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 1. Экстракция РНК из клинического материала

1. Комплект реагентов для выделения РНК – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в случае использования форм комплектации 3 и 4.
2. Ламинарный бокс.
3. Вортекс.
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс g.
5. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 50 мкл, от 20 до 200 мкл и от 100 до 1000 мкл).
7. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
8. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл в штативах.
9. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости.
10. Одноразовые наконечники до 200 мкл в штативе.
11. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
12. Холодильник от 2 до 8 °С.
13. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
14. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2. Проведение реакции обратной транскрипции и амплификации

1. Комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции – «РЕВЕРТА-L» (ТУ 9398-005-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в случае использования форм комплектации 3 и 4.
2. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
3. Центрифуга/вортекс.
4. Одноразовые полипропиленовые пробирки для проведения реакции обратной транскрипции объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в зависимости от модели используемого термостата или амплификатора, в котором проводится реакция обратной транскрипции).
5. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 50 мкл и от 20 до 200 мкл).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл и до 200 мкл в штативах.

7. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемым типом пробирок).
8. Холодильник с холодильной камерой от 2 до 8 °С и морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Емкость для сброса наконечников.
11. При постановке реакции обратной транскрипции менее чем для 10 исследуемых образцов – автоматический дозатор переменного объема (от 0,5 до 10 мкл), одноразовые наконечники с фильтром до 10 мкл в штативе.
12. Программируемый амплификатор для пробирок 0,5 мл (например, «Терцик», («ДНК-Технология», Россия)); для пробирок 0,2 мл (например, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США) или MaxyGene (Axygen, США)).

ЗОНА 3. Электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле

1. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле – «ЭФ» вариант генотип-200 (ТУ 9398-070-01897593-2008) производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
2. Камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл.
3. Источник постоянного тока с напряжением 150-460 В.
4. Столик для заливки гелей.
5. Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей.
6. Видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов и передачи изображения.
7. Аквадистиллятор или возможность централизованного получения дистиллированной воды.
8. Микроволновая печь для плавления агарозы.
9. Колба коническая из термостойкого стекла для плавления агарозы на 250 мл.
10. Мерный цилиндр на 1 л.
11. Штатив для микропробирок объемом 0,5 мл или 0,2 мл (в зависимости от типа используемых пробирок).
12. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
13. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 50 мкл).
14. Емкость для сброса наконечников.
15. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
16. Холодильник с холодильной камерой от 2 до 8 °С.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Для проведения ПЦР-исследования используется плазма 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. Хранить плазму можно не более 3 дней при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 68 °С.

СОСТАВ

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

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ⁴	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ⁴	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1 и 2.

Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 50 – комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
RT-G-mix-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	5 пробирок
RT-mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,125	5 пробирок
Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций обратной транскрипции, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1 и 2.

⁴ При хранении лизирующего раствора и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R – комплект реагентов для амплификации и дифференциации кДНК генотипов (1a, 1b, 2, 3a) HCV – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-R HCV генотипы 1a/1b раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	55 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-1-R HCV генотипы 2/3a раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	55 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2 red	Прозрачная жидкость красного цвета	1,2	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
ПКО кДНК HCV генотип 1a	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК HCV генотип 1b	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК HCV генотип 2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК HCV генотип 3a	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа выделения РНК:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов «ЭФ» вариант генотип-200 – комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл Масса, г	Кол-во
Трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	50 мл	1 флакон
Агароза для электрофореза ДНК с высоким разрешением	Порошок белого цвета	3,0 г	2 флакона

Комплект реагентов рассчитан на электрофоретический анализ 144 образцов (из расчета 100 мл геля – 3 ряда по 24 лунки). Входит в состав форм комплектации 1 и 2.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Проведение реакции обратной транскрипции.
- Проведение амплификации.
- Электрофоретическая детекция продуктов амплификации и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции РНК используется комплект реагентов **«РИБО-сорб»**, порядок работы с которым см. в **Приложении 1** – «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб».

ВНИМАНИЕ! Полученный препарат РНК хранению не подлежит, реакцию обратной транскрипции следует проводить сразу после получения РНК-пробы.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ

I. Проведение реакции обратной транскрипции

Общий объем реакционной смеси – 20 мкл, включая объем пробы РНК – 10 мкл.

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

A. Подготовка пробирок для обратной транскрипции

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

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением реакции обратной транскрипции.

1. До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе **RT-mix** и **RT-G-mix-1**. Осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл (в зависимости от модели используемого термостата или амплификатора) для проведения реакции обратной транскрипции с учетом количества исследуемых образцов и одного контроля экстракции (ОК). Промаркировать пробирки.

3. При проведении обратной транскрипции для 10-12 образцов:

- а) Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с **RT-mix** внести **5 мкл RT-G-mix-1**, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
- б) К полученному раствору добавить **6 мкл ревертазы (MMiv)**, пипетировать 5 раз, перемешать на вортексе. Осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

4. При проведении обратной транскрипции менее чем для 10 образцов:

Для приготовления реакционной смеси необходимо в отдельной пробирке смешать реагенты из расчета на 1 реакцию в следующем порядке: **10 мкл RT-mix**, **0,4 мкл RT-G-mix-1** и **0,5 мкл ревертазы (MMiv)** (см. также табл. 1). При внесении в смесь **RT-G-mix-1** и **ревертазы (MMiv)** пипетировать каждый реагент не менее 5 раз. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

ВНИМАНИЕ! Ревертаза (MMiv) термочувствительна! Не оставляйте ее при комнатной температуре в течение длительного времени! Сразу после использования убирайте в морозильную камеру холодильника!

Таблица 1

Схема приготовления реакционной смеси

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	10,0	0,4	0,5
Число клинических образцов	RT-mix	RT-G-mix-1	Ревертаза (MMiv)
4	60 ⁵	2,4	3,0
5	70	2,8	3,5
6	80	3,2	4,0
7	90	3,6	4,5
8	100	4,0	5,0

5. Внести в приготовленные пробирки по **10 мкл** готовой реакционной смеси.
6. В пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл РНК-проб**, выделенных из клинических и контрольных образцов, согласно маркировке. Осторожно перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

ВНИМАНИЕ! При добавлении РНК-проб необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

⁵ Объемы вносимых реагентов приведены с учетом количества исследуемых образцов (клинические образцы и 1 контроль этапа экстракции РНК) и запаса на 1 образец.

Б. Проведение реакции обратной транскрипции

1. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) на 37 °С на 30 мин.
2. После окончания реакции добавить в пробирки по **20 мкл ДНК-буфера**, используя новый наконечник с фильтром для каждой пробы. Перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

Полученная в реакции обратной транскрипции кДНК используется для проведения амплификации.

Готовый препарат кДНК можно хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 нед или при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

II. Проведение амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 5 мкл.

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

ВНИМАНИЕ! Каждый образец анализируется с использованием двух реакционных смесей – ПЦР-смеси-1-*R HCV* генотипы 1a/1b и ПЦР-смеси-1-*R HCV* генотипы 2/3a.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-*R HCV* генотипы 1a/1b и ПЦР-смесью-1-*R HCV* генотипы 2/3a для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб (на каждой ПЦР-смеси необходимо поставить один контроль экстракции РНК (ОК), три контроля амплификации (К– и два К+)). Промаркировать пробирки.
2. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-смеси-2 red**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-*R*.
3. Сверху добавить по капле **минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).
4. В подготовленные пробирки в соответствии с маркировкой внести по **5 мкл кДНК-проб**, полученных в реакции обратной транскрипции, причем каждый образец, в том числе ОК, необходимо внести в пробирку, содержащую ПЦР-смесь-1-*R HCV* генотипы 1a/1b, и в пробирку, содержащую ПЦР-смесь-1-*R HCV* генотипы 2/3a.

5. Поставить контрольные реакции амплификации:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К₋) – внести в пробирки с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 1a/1b и ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 2/3a по 5 мкл ДНК-буфера;
- б) положительный контроль ПЦР (К_{+1a}) – в пробирку с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 1a/1b внести 5 мкл ПКО кДНК *HCV* генотип 1a;
- в) положительный контроль ПЦР (К_{+1b}) – в пробирку с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 1a/1b внести 5 мкл ПКО кДНК *HCV* генотип 1b;
- г) положительный контроль ПЦР (К₊₂) – в пробирку с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 2/3a внести 5 мкл ПКО кДНК *HCV* генотип 2;
- д) положительный контроль ПЦР (К_{+3a}) – в пробирку с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 2/3a внести 5 мкл ПКО кДНК *HCV* генотип 3a.

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

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования (см. табл. 2 и 3).
2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и нажать кнопку продолжения программы.

Таблица 2

Программа амплификации кДНК генотипов (1a, 1b, 2, 3a) *HCV*

	Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке):								
	GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems); Omn-E (Hibaid); «Терцик» («ДНК-Технология»)			GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems); Gradient Palm Cyclor (Corbett Research)			MaxyGene (Axygen)		
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза		95 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1
2	95 °С	10 с	42	95 °С	30 с	42	95 °С	30 с	42
	68 °С	10 с		68 °С	30 с		68 °С	45 с	
	72 °С	10 с		72 °С	30 с		72 °С	45 с	
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1
4	4 °С	хранение		4 °С	хранение		10 °С	хранение	

Программа амплификации кДНК генотипов (1a, 1b, 2, 3a) HCV

Амплификатор с матричным регулированием температуры: Uno-2 (Biometra); MiniCycler, PTC-100 (MJ Research)			
цикл	температура	время	циклы
0	95 °C	пауза	
1	95 °C	5 мин	1
2	95 °C	1 мин	42
	68 °C	1 мин	
	72 °C	1 мин	
3	72 °C	1 мин	1
4	4 °C	хранение	

3. После окончания реакции пробирки отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР-амплификации (**ЗОНУ 3**). Пробы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °C (однако, перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

При проведении электрофоретической детекции **10-15 мкл ПЦР-образца** необходимо аккуратно внести в соответствующую лунку геля, избегая перетекания образцов в соседние лунки. Необходимо использовать новый наконечник для каждой пробы.

В **каждом** ряду дорожек геля должен быть обязательно представлен **K–, K+_{1a}, K+_{1b}** (для образцов, тестируемых на ПЦР-смеси-1-R HCV генотипы 1a/1b), **K+₂, K+_{3a}** (для образцов, тестируемых на ПЦР-смеси-1-R HCV генотипы 2/3a) и, желательно, **маркер молекулярных масс ДНК**.

Порядок работы при использовании комплекта реагентов «ЭФ» вариант генотип-200 производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора приведен в **Приложении 2** – «Электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле с использованием комплекта реагентов «ЭФ» вариант генотип-200».

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерпретация результатов ПЦР-исследования проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной кДНК.

Длина специфических полос амплифицированных фрагментов кДНК:

генотип 1a	– 338 п.н.
генотип 1b	– 395 п.н.
генотип 2	– 286 п.н.
генотип 3a	– 227 п.н.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции РНК, в соответствии с табл. 4.

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контрольный образец	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Специфическая полоса на электрофореграмме			
		ПЦР-смесь-1-R HCV генотипы 1a/1b		ПЦР-смесь-1-R HCV генотипы 2/3a	
		338 п.н.	395 п.н.	286 п.н.	227 п.н.
ОК	Экстракция РНК	Нет	Нет	Нет	Нет
К–	ПЦР	Нет	Нет	Нет	Нет
К+ _{1a}	ПЦР	Есть	Нет	*	*
К+ _{1b}	ПЦР	Нет	Есть	*	*
К+ ₂	ПЦР	*	*	Есть	Нет
К+ _{3a}	ПЦР	*	*	Нет	Есть

* - на данной реакционной смеси не тестируется

- В дорожках, соответствующих отрицательному контролю этапа экстракции (ОК) и отрицательному контролю этапа ПЦР (К–) не должно быть никаких полос.
- В дорожках, соответствующих положительным контролям этапа ПЦР (К+_{1a}, К+_{1b}, К+₂, К+_{3a}), должны быть яркие специфические светящиеся оранжевые полосы на соответствующих уровнях.

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

- Если результаты анализа контрольных точек не совпадают с приведенными в таблице 4, то в этом случае требуется повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа амплификации.
- Появление специфических полос в любом из отрицательных контролей (ОК, К–) указывает на контаминацию реактивов или проб. Требуется повторить анализ проб с первого этапа анализа (экстракция РНК), а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

3. Появление неспецифических полос на разных уровнях. Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора. Требуется повторить анализ проб, начиная с этапа ПЦР.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

1. Если образец при амплификации с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 1a/1b содержит специфическую светящуюся полосу на уровне **338 п.н.** и не содержит специфических светящихся полос при амплификации с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 2/3a, то для данного образца выдается результат **«Генотип 1а»**;
2. Если образец при амплификации с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 1a/1b содержит специфическую светящуюся полосу на уровне **395 п.н.** и не содержит специфических светящихся полос при амплификации с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 2/3a, то для данного образца выдается результат **«Генотип 1b»**;
3. Если образец при амплификации с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 2/3a содержит специфическую светящуюся полосу на уровне **286 п.н.** и не содержит специфических светящихся полос при амплификации с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 1a/1b, то для данного образца выдается результат **«Генотип 2»**;
4. Если образец при амплификации с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 2/3a содержит специфическую светящуюся полосу на уровне **227 п.н.** и не содержит специфических светящихся полос при амплификации с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 1a/1b, то для данного образца выдается результат **«Генотип 3а»**;
5. Если образец содержит несколько специфических полос, то выдается двойной, тройной и т.д. генотип. Например, если образец при амплификации с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 1a/1b содержит специфическую светящуюся полосу на уровне **395 п.н.**, а при амплификации с ПЦР-смесью-1-R *HCV* генотипы 2/3a – на уровне **227 п.н.**, то для данного образца выдается результат **«Генотипы 1b и 3а»**;
6. Если образец не содержит специфических полос и
 - а) известно, что концентрация РНК *HCV* в этом образце находится в пределах аналитической чувствительности набора реагентов, то выдается результат **«Генотип не определен по причине низкой вирусной нагрузки»**;
 - б) концентрация РНК *HCV* для данного образца неизвестна, то требуется повторить исследование для этого образца, начиная с первого этапа (экстракция РНК). Если при повторном исследовании вновь отсутствуют специфические светящиеся полосы, то выдается результат **«Генотип не определен»**.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 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. Комплекты реагентов «РИБО-сорб», «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» хранить при температуре не выше минус 16 °С. Комплект реагентов «ЭФ» хранить при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

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

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель 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.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® HCV-генотип-EPh» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии (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)⁶.

⁶ 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 и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Зав. Кафедрой клинической лабораторной
диагностики ФГБОУ ДПО РМАПО
Министерства Здравоохранения РФ
д.м.н., профессор

В.В. Долгов

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

Порядок работы

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °C) прогреть при температуре 60 °C до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный контроль выделения).
3. В пробирки внести по **450 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.
4. В пробирки с **лизирующим раствором** внести по **100 мкл пробы**, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**.
5. Плотные закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.
6. Ресуспендировать **сорбент**, интенсивно перемешивая на вортексе. Добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **25 мкл ресуспендированного сорбента**.
7. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 10 мин при комнатной температуре, тщательно перемешивая каждые 2 мин.
8. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g (например, 10000 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.
9. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
10. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
11. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Отобрать раствор для отмывки 3 из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
12. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Перемешать на

вortexе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Полностью отобрать раствор для отмывки 4 из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.

13. Высушить сорбент, поместив пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре 60 °C на 15 мин.

14. Ресуспендировать сорбент в **50 мкл РНК-буфера**. Прогреть в термостате при температуре 60 °C 2 мин, перемешать на vortexе и осадить сорбент на центрифуге при 12 тыс g (например, 13400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.

ВНИМАНИЕ! Полученный препарат РНК хранению не подлежит, реакцию обратной транскрипции следует проводить сразу после получения РНК-пробы. Отбирать раствор РНК для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле с использованием комплекта реагентов «ЭФ» вариант генотип-200 (проводится в ЗОНЕ 3 - помещении для детекции продуктов амплификации методом электрофореза).

ВНИМАНИЕ! РАБОТА С АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ ДНК ДОЛЖНА ПРОВОДИТЬСЯ В ИЗОЛИРОВАННОМ ПОМЕЩЕНИИ СОТРУДНИКОМ ЛАБОРАТОРИИ, НЕ ПРОИЗВОДЯЩИМ МАНИПУЛЯЦИЙ В ДРУГИХ ЗОНАХ ПЦР-ЛАБОРАТОРИИ.

Приготовление рабочих растворов и агарозного геля

1. Приготовить рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить **25 мл трис-боратного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия**, довести **дистиллированной водой до 500 мл**, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать.

ВНИМАНИЕ! Этидия бромид – канцерогенное соединение, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой. Все реагенты, содержащие этидия бромид, перед утилизацией следует подвергать специальной обработке.

2. **Агарозу для электрофореза ДНК с высоким разрешением** из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить **100 мл** рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до температуры 65-70 °С.
3. Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры для горизонтального электрофореза. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее **5 см** друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.
4. После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре) осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру для горизонтального электрофореза, лунки должны

располагаться ближе к отрицательному электроду (ДНК будет двигаться к положительному). Залить в камеру для горизонтального электрофореза готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

Порядок работы

1. Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив последовательно, отобрать из-под слоя масла по **10–15 мкл проб** и аккуратно внести в лунки геля, избегая перетекания образцов в соседние лунки. Необходимо использовать новый наконечник для каждой пробы. В **каждом** ряду дорожек геля должны быть обязательно представлены **K–, K+_{1a}, K+_{1b}** (для ПЦР-смеси-1-R *HCV* генотипы 1a/1b), **K+₂, K+_{3a}** (для ПЦР-смеси-1-R *HCV* генотипы 2/3a) и, желательно, маркер молекулярных масс ДНК.
2. Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. Если нет нарушения контактов, то при прохождении тока от электродов должны подниматься пузырьки. При использовании камеры «SE-2» (Хеликон) и источника питания «Эльф-4» («ДНК-Технология») параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза – 40 мин. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см.
3. По завершении времени электрофореза (краситель крезоловый красный при этом пройдет примерно 2/3 длины геля (~ 3,5 см) выключить источник тока и перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения.

ВНИМАНИЕ! При просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены маской или стеклянной пластиной!

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

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 26 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

В.В.Малеев

