

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от «___» _____ 2009 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»



В.Г. Нестеренко

_____ 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению «Abbott RealTime HCV Genotype II»

Набор реагентов *in vitro* для определения генотипа вируса гепатита С методом ПЦР в режиме реального времени.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II», далее по тексту – Набор, предназначен для определения генотипа вируса гепатита С методом ПЦР в режиме реального времени.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Набор реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» предназначен для проведения *in vitro* обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с целью определения генотипа (генотипов) вируса гепатита С (HCV) в сыворотке и плазме крови HCV-инфицированных пациентов.

Набор «Abbott RealTime HCV Genotype II» не предназначен для использования в качестве скринингового теста на выявление HCV в донорской крови, плазме, сыворотке или ткани, а также для использования в качестве диагностического теста для подтверждения присутствия HCV-инфекции.

СОДЕРЖАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Геном вируса HCV представляет собой одноцепочечную молекулу РНК, размером 9,500 нуклеотидов¹. Вирус HCV был идентифицирован как главный этиологический агент гепатитов ни-А, ни-В. На основании генетического сходства у вируса HCV выделяют шесть основных генотипов (1 – 6) и многочисленные субтипы². Генотип вируса гепатита С определяет реакцию HCV-инфицированных пациентов на комбинированную терапию пег-интерфероном/рибавирином³. Перед началом комбинированной терапии для выбора наиболее оптимального режима обязательно рекомендуется определять генотип вируса гепатита С⁴.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

Набор «Abbott RealTime HCV Genotype II» состоит из двух частей:

- Набор реагентов для проведения амплификации Abbott RealTime HCV Genotype II Amplification Reagent Kit
- Набор контролей Abbott RealTime HCV Genotype II Control Kit

В наборе реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» используется технология ОТ-ПЦР для амплификации РНК HCV из клинических образцов. В начале процесса пробоподготовки в каждый образец вносится последовательность РНК, неродственная последовательности HCV. Эта неродственная последовательность РНК амплифицируется совместно с последовательностью HCV и выступает в качестве внутреннего контроля (ВК), подтверждающего правильность протекания реакции ОТ-ПЦР в каждом образце. Набор реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» выявляет генотипы 1, 2, 3, 4, 5 и 6, а также субтипы 1a и 1b при помощи флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, специфичных для каждого генотипа.

Пробоподготовка

Система Abbott *m2000sp* позволяет проводить автоматическое выделение нуклеиновых кислот, используя специальные магнитные частицы и соответствующие протоколы исследования [Abbott *mSample Preparation System* (4 x 24 Preps)] из 0.2 мл или 0.5 мл исходного образца (плазмы, собранной в пробирки с ACD-A, CPD, калий-EDTA или натрий-EDTA или сыворотки крови). В качестве альтернативного варианта можно использовать ручное выделение нуклеиновых кислот с помощью реагентов Abbott *mSample Preparation System*.

Во время процесса пробоподготовки вирусные частицы разрушаются гуанидин изотиоцианатом, РНК связывается с магнитными микрочастицами, ингибиторы

удаляются промыванием и, на последнем этапе, РНК смывается с магнитных частиц специальным буфером. В начале процесса пробоподготовки в каждый образец вносится внутренний контроль, благодаря которому осуществляется наблюдение за правильностью прохождения данного процесса всеми образцами и контролями.

В автоматической системе пробоподготовки Abbott *mSample Preparation System* (4 x 24 Preps) используется технология магнитных частиц для связывания с нуклеиновыми кислотами и последующее промывание частиц для удаления не связавшихся компонентов. Затем связанные нуклеиновые кислоты элюируются и переносятся в 96-луночный планшет. С этого момента нуклеиновые кислоты могут использоваться для процесса амплификации.

Приготовление реагентов и сборка реакционных планшето

Прибор Abbott *m2000sp* готовит три реакционных смеси (А, В и С), смешивая соответственные олигонуклеотидные реагенты Abbott RealTime HCV Genotype II (А, В или С) с термостабильной полимеразой *rTth* и активирующим реагентом. Затем система Abbott *m2000sp* вносит определенное количество полученной смеси мастер-микс в ячейки 96-луночного оптического планшета Abbott 96-Well Optical Reaction Plate в месте с аликвотами выделенных нуклеиновых кислот. Каждый образец вносится в лунку планшета, содержащую реакционную смесь А, лунку планшета, содержащую реакционную смесь В и лунку планшета, содержащую реакционную смесь С.

При ручном процессе пробоподготовки пользователи самостоятельно готовят реакционные смеси, используя реагенты Abbott RealTime HCV Genotype II, а затем вносят готовые смеси и выделенные нуклеиновые кислоты в реакционный планшет.

Планшет вручную заклеивается специальной оптической пленкой, после чего он готов к переносу в аппарат Abbott *m2000rt*.

Амплификация

В наборе реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» имеется четыре набора праймеров для реакции ПЦР. Один набор праймеров направлен на последовательность региона 5'-*utr* (5'-нетранслируемая область) генома HCV. Данные праймеры необходимы для того, чтобы амплифицировать все изоляты вируса HCV, имеющиеся в анализируемом образце. Второй набор праймеров создан для амплификации области NS5b вирусов HCV, обладающих генотипом 1a. Третий набор праймеров разработан для амплификации области NS5b вирусов HCV, обладающих генотипом 1b. Последний набор праймеров – это праймеры для внутреннего контроля, благодаря которым происходит амплификация участка гена гидроксилирует редуктазы тыквы, *Cucurbita pepo*. Этот ген обработан частицами Armored RNA® и внесен в отрицательную плазму человека.

В ходе реакции амплификации, на основании РНК HCV проводится синтез кДНК благодаря обратнo-транскриптазной активности термостабильной ДНК-полимеразы *rTth*⁵. На первом этапе праймеры для обратнoй транскрипции отжигаются на соответствующих участках генома вируса HCV и внутреннегo контроля, и далее, во время пролонгированного периода инкубации, происходит синтез комплементарной цепи ДНК. После этапа денатурации, при котором температура реакции превышает точку плавления комплекса двуцепочечная кДНК:РНК, на цепь кДНК отжигается второй праймер, и, благодаря ДНК-полимеразной активности фермента *rTth*, происходит синтез двуцепочечного продукта ДНК.

Во время каждого цикла продукты амплификации под действием высокой температуры распадаются на отдельные цепи, способствуя отжигу праймеров и последующей элонгации растущих цепей при понижении температуры. Экспоненциальная амплификация продукта достигается многократным повторением цикла высоких и низких температур, что приводит к амплификации анализируемой последовательности в миллион и более раз.

Детекция

Данный набор предусматривает три отдельные реакции для детекции генотипов 1, 2, 3, 4, 5 и 6, а также субтипов 1a и 1b вируса гепатита С:

Реакция А позволяет проводить детекцию всех изолятов вируса HCV, субтипа 1a и генотипа 3.

Реакция В позволяет проводить детекцию генотипа 2, субтипа 1b и генотипа 1.

Реакция С позволяет проводить детекцию генотипов 4, 5 и 6.

Амплификация мишеневых участков РНК HCV и внутреннего контроля происходит одновременно, в ходе одной реакции. Для детекции РНК HCV и внутреннего контроля используются специфичные зонды, меченые различными флуорофорами, что позволяет проводить одновременную детекцию обоих ПЦР-продуктов.

На этапе детекции каждого цикла амплификации, пробы HCV и ВК отжигаются со своими мишенями, в том случае, если последние присутствуют в смеси.

5'-Конец каждого HCV-специфичного зонда несет флуоресцентный краситель, а 3'-конец – гаситель флуоресценции и молекулу, связывающуюся с малой бороздкой ДНК (Minor Groove Binder (MGB)).

В отсутствии последовательностей HCV флуоресценция проб гасится. В присутствии последовательностей HCV, пробы гибридизируются с комплементарными последовательностями. На этапе элонгации 5'-3'-экзонуклеазная (или Taqman) активность ДНК-полимеразы *rTth* приводит к разрушению отжегшихся зондов, происходит разделение флуорофора и гасителя флуоресценции, флуоресценция и последующая детекция сигнала⁶.

Прибор Abbott m2000rt считывает результаты на каждом цикле амплификации в каждой лунке реакционного планшета.

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ КОНТАМИНАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Вероятность контаминации нуклеиновых кислот минимальна, так как:

- Обратная транскрипция, ПЦР-амплификация и гибридизация олигонуклеотидов происходят в заклеенном реакционном 96-луночном планшете.
- Детекция проводится автоматически, без необходимости открывать 96-луночный планшет.
- При постановке реакций для автоматических пипеток используются только наконечники с аэрозольными фильтрами, сбрасываемые после применения.
- Работа с набором реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» проводится в специально отведенных помещениях. Подробнее – в разделе ОСОБЫЕ МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ данного руководства.

РЕАГЕНТЫ

Набор реагентов для амплификации Abbott RealTime HCV Genotype II Amplification Reagent Kit (List No. 8K24-90)

1. Внутренний контроль Abbott RealTime HCV Genotype II (List No. 8K24Y) (2 пробирки, 1.2 мл в каждой).

< 0.01% неинфекционной, обработанной специальными частицами Armored РНК внутреннего контроля в отрицательной плазме человека. Отрицательная плазма человека протестирована и не содержит HBsAg, ДНК HBV, РНК ВИЧ, РНК HCV, анти-ВИЧ-1/ВИЧ-2, и анти-HCV.

Консерванты: 0.1% ProClin® 300 и 0.15% ProClin 950.

2. Реагенты для амплификации Abbott RealTime HCV Genotype II (List No. 8K24)

(1) Реагенты для амплификации, упаковка А (Amplification Reagent Pack A):

- 1 пробирка (0.9 мл) олигонуклеотидов HCV Genotype II, Реагент А.
<0.1% синтетических олигонуклеотидов (6 праймеров и 5 зондов), < 0.1% dNTPs и 10.4% диметилсульфоксида в буферном растворе с соответствующим красителем. Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.
- 1 пробирка (0.141 мл) с термостабильной полимеразой rTth (от 2.9 до 3.5 единиц/мкл) в буферном растворе.
- 1 пробирка (0.400 мл) с активирующим реагентом.

30 mM раствор хлорида марганца. Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.

В): (2) Реагенты для амплификации, упаковка В (Amplification Reagent Pack B):

- 1 пробирка (0.9 мл) олигонуклеотидов HCV Genotype II, Реагент В.
<0.1% синтетических олигонуклеотидов (6 праймеров и 5 зондов), < 0.1% dNTPs и 10.4% диметилсульфоксида в буферном растворе с соответствующим красителем. Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.
- 1 пробирка (0.141 мл) с термостабильной полимеразой rTth (от 2.9 до 3.5 единиц/мкл) в буферном растворе.
- 1 пробирка (0.400 мл) с активирующим реагентом.
30 mM раствор хлорида марганца. Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.

С): (3) Реагенты для амплификации, упаковка С (Amplification Reagent Pack C):

- 1 пробирка (0.9 мл) олигонуклеотидов HCV Genotype II, Реагент С.
<0.1% синтетических олигонуклеотидов (4 праймера и 4 зонда), < 0.1% dNTPs и 10.4% диметилсульфоксида в буферном растворе с соответствующим красителем. Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.
- 1 пробирка (0.141 мл) с термостабильной полимеразой rTth (от 2.9 до 3.5 единиц/мкл) в буферном растворе.
- 1 пробирка (0.400 мл) с активирующим реагентом.
30 mM раствор хлорида марганца. Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.

Примечание: Все реагенты для амплификации предназначены только для одноразового использования. Во флаконах с реагентами после постановки реакции остается некоторое количество реагентов. Неиспользованные реагенты должны быть утилизированы.

Набор контролей Abbott RealTime HCV Genotype II Control Kit (List No. 8K24-80)

1. Отрицательный контроль Abbott RealTime HCV Genotype II (List No. 8K24Z) (4 пробирки, 1.3 мл в каждой). Отрицательная плазма человека протестирована и не содержит HBsAg, ДНК HBV, РНК ВИЧ, РНК HCV, анти-ВИЧ-1/ВИЧ-2, и анти-HCV.

Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.

2. Положительный контроль Abbott RealTime HCV Genotype II (List No. 8K24W) (4 пробирок, 1.3 мл в каждой). Неинфекционная, обработанная специальными частицами Armored РНК, представляющая 5'-нетранслируемую область (5'-UTR) генотипа 1a HCV и 5'-UTR генотипа 4 в отрицательной плазме человека. Отрицательная плазма человека протестирована и не содержит HBsAg, ДНК HBV, РНК ВИЧ, РНК HCV, анти-ВИЧ-1/ВИЧ-2, и анти-HCV. Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Использовать только для диагностики *In Vitro*.

Данный набор реагентов не может быть использован в качестве скринингового теста на выявление HCV в донорской крови, плазме, сыворотке или тканях или в качестве диагностического теста на подтверждение HCV-инфекции.

Меры предосторожности

Должны соблюдаться в соответствии с рекомендациями, приведенными в инструкциях к приборам Abbott m2000sp и Abbott m2000rt или в описании процесса ручной пробоподготовки с использованием набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II».

ВНИМАНИЕ: Данный продукт содержит потенциально инфицированные компоненты, в том числе клетки крови человека.

Для более подробной информации обратитесь к разделу РЕАГЕНТЫ данного руководства.

Компоненты, выделенные из тканей человека, протестированы и не содержат HBsAg, ДНК HBV, РНК ВИЧ, РНК HCV, анти-ВИЧ-1/ВИЧ-2, и анти-HCV. Однако ни один из известных тестов не может полностью гарантировать то, что компоненты, изолированные из тканей человека или инактивированных микроорганизмов не способны переносить инфекцию. Поэтому все материалы из тканей человека должны рассматриваться как потенциально инфекционные. Всю работу с такими реагентами и клиническими образцами рекомендуется проводить в соответствии со стандартами по работе с патогенами крови OSHA⁷. При работе с материалами, которые содержат или могут содержать инфицирующие агенты, должен соблюдаться Уровень Биобезопасности 2⁸ или другие подходящие меры предосторожности^{9,10}, в частности рекомендуется:

- Использовать перчатки при работе с клиническими образцами и реагентами.
- Не пипетировать при помощи рта.
- Не есть, не пить, не курить, не пользоваться косметикой и не прикасаться руками к контактными линзам в рабочих областях лаборатории.

- При попадании зараженного материала на какую-либо поверхность вымыть и продезинфицировать ее с использованием подходящих дезинфицирующих растворов, например 1.0% раствора гипохлорита натрия^{11,12}.
- Проводить деконтаминацию и удаление всех потенциально инфицированных материалов в соответствии с местными указаниями и рекомендациями^{13,14}.

Набор контролей, внутренний контроль, смеси олигонуклеотидов А, В и С, а также активирующий реагент набора «Abbott RealTime HCV Genotype II» содержат смесь 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-она и 2-метил-4-изотиазолин-3-она, веществ, являющихся компонентами ProClin. Эти компоненты классифицированы Директивами Европейского Сообщества как вещества, вызывающие раздражение (Xi).

Далее приводятся обозначения, указывающие на риск (R) и обеспечение безопасности (S) при работе с веществами:

R43 Могут вызывать повышенную чувствительность при контакте с кожей.

R36/38 Вызывают раздражение глаз и кожи.

S24 Избегать контакта с кожей.

S25 Избегать попадания в глаза.

S35 Эти материалы и их компоненты должны уничтожаться безопасным способом.

S37 Использовать перчатки.

S39 Использовать подходящие средства защиты для глаз/лица.

S46 При проглатывании немедленно оказать медицинскую помощь и показать врачу упаковку реагента.

ОСОБЫЕ МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Меры предосторожности при работе

При работе с набором «Abbott RealTime HCV Genotype II» для хранения клинических образцов и в процессе анализа рекомендуется использовать только пробирки с завинчивающейся крышкой, как указано в разделе **СБОР КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ, ИХ ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА К МЕСТУ ИССЛЕДОВАНИЯ**.

Для максимального снижения риска перекрестной контаминации между образцами в процессе пробоподготовки, а также для предотвращения случайного внесения рибонуклеаз (РНаз) в образцы во время и после выделения РНК, необходимо владеть навыками хорошей лабораторной практики. При

работе с РНК всегда должны применяться соответствующие асептические технологии. Реакции амплификации, такие как ПЦР, чувствительны к случайному попаданию продуктов ранее проведенных реакций амплификации. В том случае, если клинические образцы или реагенты, используемые для проведения реакции ПЦР в реальном времени оказались контаминированы случайным попаданием даже нескольких молекул ранее амплифицированного продукта, возможно получение неверных результатов. Физическое разделение действий, производимых при постановке реакции ПЦР, в сочетании с хорошей лабораторной практикой позволяют значительно снизить риск контаминации.

Рабочие области

Используйте три специальные области в лаборатории при работе с набором реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» с использованием прибора Abbott m2000rt и ручной пробоподготовки:

- **Область приготовления реагентов** используется для приготовления реакционных смесей А, В и С из компонентов набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» и для внесения аликвот полученных смесей в реакционный планшет. Лабораторная одежда, пипетки, наконечники для пипеток и вортексы, используемые в Области приготовления реагентов должны оставаться в ней и не переноситься в Область приготовления образцов или Область амплификации.
- **Область приготовления образцов** используется для работы с образцами (клиническими образцами и контролями набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II»), а также для внесения выделенных образцов и контролей в 96-луночные оптические планшеты Abbott 96-Well Optical Reaction Plate. Все реагенты, используемые в Области приготовления образцов, должны постоянно находиться в этой области. Лабораторная одежда, пипетки, наконечники для пипеток и вортексы, используемые в Области приготовления образцов, должны оставаться в ней и не переноситься в Область приготовления реагентов или в Область амплификации. Продукты амплификации не должны попадать в Область приготовления образцов.
- **Область амплификации** используется для амплификации и детекции амплифицированного продукта. Лабораторная одежда и оборудование, используемые в Области амплификации, должны оставаться в ней и не переноситься в Область приготовления реагентов и в Область приготовления образцов.

При применении аппаратов Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt* рекомендуется использование только двух специальных областей, Области приготовления образцов и Области амплификации.

Компоненты каждого набора данной тест-системы должны использоваться только вместе. Не смешивайте компоненты из разных наборов. Например, не используйте отрицательный контроль из набора контролей лота X с положительным контролем из набора контролей лота Y. Кроме того, не смешивайте и не используйте в одной постановке реагенты для амплификации A, B и C.

Не используйте наборы или реагенты с просроченным сроком годности.

Рабочие области и используемые инструменты должны рассматриваться как потенциальные источники контаминации. После контакта с веществами, которые могут рассматриваться в качестве источников контаминации (клинические образцы, элюаты и/или продукты амплификации) необходимо сменить перчатки, прежде чем работать с неоткрытыми реагентами, отрицательным и положительным контролями или образцами. Для правильной очистки приборов обратитесь к руководствам по использованию аппаратов Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*.

Если процесс работы прибора Abbott *m2000sp* прерывается, удалите все продукты реакции и реагенты в соответствии с руководством по использованию данного прибора. Если прерывается протокол внесения реакционной смеси в аппарате Abbott *m2000sp*, поместите 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate в пластиковый пакет и утилизируйте в соответствии с руководством по использованию прибора Abbott *m2000sp*, раздел Факторы риска, вместе с перчатками, используемыми при данной работе.

Если прерывается процесс работы аппарата Abbott *m2000rt*, поместите 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate в пластиковый пакет и утилизируйте в соответствии с руководством по использованию прибора Abbott *m2000rt* вместе с перчатками, используемыми при данной работе.

Деконтаминируйте и утилизируйте все клинические образцы, реагенты и другие материалы, несущие потенциальную биологическую опасность, в соответствии с местными требованиями и рекомендациями^{13,14}. Все материалы должны использоваться таким образом, чтобы снизить риск возможной контаминации в рабочих областях.

ВНИМАНИЕ: При автоклавировании закрытого реакционного планшета не происходит деградации амплифицированного продукта, и при последующем открывании планшета может происходить контаминация. Контаминация лабораторных областей амплифицированным продуктом

может происходить и в том случае, если загрязняющие материалы неаккуратно собираются и утилизируются.

Аэрозольная контаминация

Для того чтобы сократить риск контаминации нуклеиновых кислот при ручном пипетировании, необходимо использовать наконечники с аэрозольными фильтрами. Наконечники не должны использоваться многократно. При попадании клинических материалов или реагентов на какую-либо поверхность необходимо очистить и дезинфицировать ее в соответствии с инструкциями к приборам Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*.

Контаминация и ингибирование

Для минимизации риска контаминации РНазами, перекрестной контаминации между образцами и ингибирования должны соблюдаться следующие меры предосторожности:

- Носить специальную защитную одежду.
- Использовать перчатки без талька.
- Менять перчатки после каждого контакта с веществами, являющимися потенциальными контаминаторами (такими как клинические образцы, элюаты и/или амплифицированные продукты).
- При пипетировании использовать наконечники с аэрозольными фильтрами. Длина наконечника должна быть достаточной для предотвращения контаминации канала автоматической пипетки. Во время пипетирования необходимо избегать соприкосновения канала автоматической пипетки с внутренней поверхностью пробирок с образцами. Рекомендуется использование удлиненных наконечников с аэрозольными фильтрами.
- Меняйте наконечник пипетки при КАЖДОМ переносе раствора.
- Реагенты системы для пробоподготовки Abbott *mSample Preparation System* (4 x 24 Preps) предназначены только для однократного использования. Для каждой постановки анализа с использованием набора «Abbott RealTime HCV Genotype II» используйте новые реагенты и новые пробирки для смешивания реагентов и постановки реакции. После завершения каждой реакции удалите все оставшиеся реагенты в соответствии с инструкцией к прибору Abbott *m2000sp* и инструкцией к системе пробоподготовки Abbott *mSample Preparation System* (4 x 24 Preps).

КОНТАМИНАЦИЯ dU-СОДЕРЖАЩИМИ ПЦР-ПРОДУКТАМИ

Те лаборатории, где используются (или использовались) тест-системы для амплификации РНК HCV, включающие в себя работу с амплифицированным продуктом (например, электрофоретическую или ГиФа детекцию), могут быть контаминированы dU-содержащими ПЦР-продуктами. Следовательно, результаты, полученные в таких лабораториях с помощью набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II», также могут оказаться некорректными.

Если при постановке реакции отрицательный контроль постоянно дает положительные результаты, или наличие dU-содержащих ПЦР-продуктов выявляется каким-либо иным способом, рекомендуется провести проверку лаборатории на наличие контаминации. Протокол данной процедуры (08K24-66) можно получить у представителя компании Abbott.

ТРЕБОВАНИЯ ПО ХРАНЕНИЮ

Набор реагентов для амплификации Abbott RealTime HCV Genotype II Amplification Reagent Kit (No. 8K24-90)

- Пробирки с набором реагентов Abbott RealTime HCV Genotype II Amplification Reagent Pack и внутренним контролем должны храниться при температуре -10 °C или ниже. Не допускать прямого контакта реагентов для амплификации Abbott RealTime HCV Genotype II Amplification Reagent Pack с образцами и контролями.

Набор контролей Abbott RealTime HCV Genotype II Control Kit (No. 8K24-80).

- Отрицательный и положительный контроли Abbott RealTime HCV Genotype II должны храниться при температуре -10 °C или ниже.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

- Набор реагентов для амплификации Abbott RealTime HCV Genotype II Amplification Reagent Kit: Транспортировать в сухом льду.
- Набор контролей Abbott RealTime HCV Genotype II Control Kit: Транспортировать в сухом льду.

ИНДИКАЦИЯ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ ПОРЧИ РЕАГЕНТОВ

Если значения положительного или отрицательного контролей отклоняются от ожидаемых результатов, это может указывать на порчу реагентов. В этом случае результаты соответствующих тестов неверны и образцы должны быть протестированы снова.

СБОР ОБРАЗЦОВ, ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА К МЕСТУ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сбор и хранение образцов

Для набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» могут использоваться клинические образцы сыворотки и плазмы крови человека (на ACD-A, CPD, калий-EDTA или натрий-EDTA).

Сбор образцов в специальные пробирки производится в соответствии с инструкциями фирм-изготовителей.

Цельная кровь до центрифугирования может храниться не более 6 часов при 2-30 °С.

После центрифугирования отделите сыворотку или плазму от клеток. Образцы сыворотки и плазмы могут храниться:

- при 15-30 °С не более 24 часов
- при 2-8 °С не более 3 дней
- при -70 °С или ниже – длительное время^{15,16}

Необходимо избегать многократного размораживания сыворотки или плазмы. Размораживайте образцы при температуре 15-30 °С или при 2-8 °С. Размороженные образцы могут храниться при 2-8 °С не более 6 часов.

Мутные образцы, или образцы, в которых наблюдаются твердые частицы, перед исследованием необходимо отцентрифугировать при 2,000 g в течение 5 минут.

Транспортировка образцов

Транспортируйте замороженные образцы в сухом льду. Для местных и международных перевозок образцы должны быть упакованы и промаркированы в соответствии с местными и международными требованиями для транспортировки клинических, диагностических или биологических образцов.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

На приборы Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt* перед проведением исследования должен быть установлен протокол исследования Abbott RealTime HCV Genotype II со специального диска Abbott RealTime HCV Genotype II *m2000* System ROW Combined Application CD-ROM. За подробной информацией обратитесь к инструкциям по использованию приборов Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ABBOTT REALTIME HCV GENOTYPE II

Основные реагенты:

- Набор реагентов для амплификации Abbott RealTime HCV Genotype II Amplification Reagent Kit (No. 8K24-90)

Дополнительные реагенты и материалы:

- Набор контролей Abbott RealTime HCV Genotype II Control Kit (No. 8K24-80)
- Материалы, необходимые для ручной пробоподготовки, перечислены в разделе Необходимое оборудование и материалы инструкции по ручному выделению образцов с использованием набора «Abbott RealTime HCV Genotype II» (List No. 02N04).

Для Области приготовления образцов:

- Инструкция по работе с прибором Abbott *m2000sp* (List No. 09K20).
- Прибор Abbott *m2000sp* (List No. 9K14).
- Программное обеспечение Abbott *m2000sp* Software Версия 3.0 или выше.
- Реагенты для пробоподготовки Abbott *m* Sample Preparation System (4 x 24 Preps) (List No. 4J70-24).
- Штативы для пробирок с образцами.
- Откалиброванные автоматические пипетки на 20-1000 мкл.
- Наконечники с аэрозольными фильтрами для пипеток на 20-1000 мкл.
- Пробирки для образцов диаметром 10.0 - 16 мм.
- Наконечники для пипеток на 200 мкл и 1000 мкл.
- Реакционные пробирки на 5 мл.
- Центрифуга, способная набрать 2000 g и 5000 g.
- Оптические клеящиеся пленки Abbott Optical Adhesive Covers.
- Аппликаторы для пленок Abbott Adhesive Cover Applicators.
- Защитная подставка под реакционный планшет Abbott Splash-Free Support Base.
- Транспортировочные пробирки (пробирки для смеси мастер-микс).
- Контейнеры для реагентов на 200 мл.
- Реакционные планшеты с глубокими лунками Abbott 96 Deep-Well Plates.
- Диск с протоколами исследования Abbott RealTime HCV Genotype II *m2000* System ROW Combined Application CD-ROM (List No. 08L36).
- Вортекс.
- Вода, не содержащая РНаз (Производства Eppendorf Scientific, Inc. или эквивалентная)[†]
- Микроцентрифужные пробирки на 1.7 мл, свободные от РНаз (Производства Dot Scientific, Inc. или эквивалентные)[†]
- Ватные палочки (Производства Puritan или эквивалентные)[†]

†Примечание: Три последние позиции необходимы для процедуры Мониторинга лаборатории на присутствие контаминации. Для подробной информации обратитесь к разделу КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА данного руководства.

Для области приготовления реагентов:

- Кулер StrataCooler® 96 Benchtop Cooler.
- Инструкция к кулеру.
- Оптические 96-луночные реакционные планшеты Abbott 96-Well Optical Reaction Plate.

Для области амплификации:

- Прибор Abbott *m2000rt* (List No. 9K15).
- Программное обеспечение Abbott *m2000rt* Software Версия 2.1 или выше.
- Диск с протоколами исследования Abbott RealTime HCV Genotype II *m2000* System ROW Combined Application CD-ROM (List No. 08L36).
- Инструкция по работе с прибором Abbott *m2000rt* (List No. 09K25).
- Приложение к инструкции по работе с прибором Abbott *m2000rt* (List No. 02N06-01).
- Набор калибраторов Abbott *m2000rt* Optical Calibration Kit (List No. 4J71-93)
- Приложение к инструкции по работе с прибором Abbott *m2000rt* (List No. 02N39-01).

Другие материалы:

- Биобезопасный ламинар, подходящий для работы с инфицированными материалами.
- Пластиковые мешки для отработанного материала.

Меры предосторожности при проведении процедуры

Перед проведением исследования внимательно прочитайте все вложенные инструкции.

Пробирки, содержащие внутренний контроль набора «Abbott RealTime HCV Genotype II», отрицательный контроль и положительный контроль предназначены только для однократного использования и должны быть утилизированы после использования.

Перед началом работы необходимо убедиться, что в пробирках с образцами нет пузырей воздуха. Если пузыри присутствуют, их необходимо удалить, используя стерильные наконечник для пипеток. Пузыри воздуха, находящиеся в

контейнерах с реагентами, могут мешать правильной детекции уровня жидкости, и, следовательно, приводить к забору неверных объемов реагентов и получению ошибочных результатов.

Для того чтобы предотвратить перекрестную контаминацию, при пипетировании образцов, ВК, контролей и реагентов для амплификации необходимо каждый раз использовать новые стерильные наконечники для пипеток с аэрозольными фильтрами. Чтобы предотвратить возможность контаминации канала автоматической пипетки, важно не допускать соприкосновения канала пипетки с внутренней стороной пробирок или контейнеров с образцами.

Принцип проведения мониторинга на присутствие амплифицированных продуктов описан в разделе **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА** данного руководства. Для того чтобы снизить риск контаминации нуклеиновых кислот, при попадании зараженного материала на какую-либо поверхность необходимо вымыть и продезинфицировать ее с использованием подходящих дезинфицирующих растворов, например 1.0% раствора гипохлорита натрия. Контроли набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» должны готовиться одновременно с тестируемыми образцами. Использование Контролей набора реагентов «RealTime HCV Genotype II» обязательно при проведении данного исследования. Для подробной информации обратитесь к разделу **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА** данного руководства.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Хранение и подготовка образцов должны осуществляться только в Области Приготовления Образцов. Перед началом процесса пробоподготовки внимательно изучите раздел Меры Предосторожности данного руководства.

Для подробного описания принципов проведения исследований на приборах Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt* обратитесь к инструкциям по их использованию, раздел Инструкции по работе с прибором.

Персонал лаборатории должен быть обучен работе на приборах Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*. Операторы должны владеть принципами хорошей лабораторной практики и в полном объеме знать программное обеспечение указанного оборудования.

1. За одну постановку максимально можно проанализировать 24 образца, или провести 72 реакции (по 3 реакции на каждый образец). В каждую постановку обязательно включаются положительный и отрицательный контроли, и, таким образом, максимально в одну постановку можно взять 22 клинических образца.

• Проверьте объем анализируемых образцов. Минимальные объемы образцов, используемые при работе с набором реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» и соответствующие требования к штативам для пробирок с образцами, следующие:

Минимальный объем образца для анализа с помощью набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II»

Размер ячейки	Диаметр пробирки*	0.2 мл	0.5 мл
13 мм	11.6 мм - 14.0 мм	0.7 мл	1.0 мл
16 мм	15.0 мм - 16.0 мм	1.0 мл	1.3 мл
13 мм	Реакционные пробирки	0.5 мл	0.8 мл

* внешний диаметр пробирки

• Если образцы были заморожены, разморозьте их при температуре 15-30 °C или при 2-8 °C. Размороженные образцы можно хранить при температуре 2-8 °C не более 6 часов.

• Перед началом работы перемешайте каждый образец на вортексе три раза в течение 2-3 секунд. Убедитесь, что в пробирках с образцами нет пузырей воздуха или пены. Если пузыри воздуха или пена присутствуют, удалите их, используя стерильный одноразовый наконечник. Мутные образцы и образцы, в которых наблюдается наличие твердых частиц, перед исследованием необходимо отцентрифугировать при 2,000 g в течение 5 минут. Перенесите необходимое количество исследуемого образца в чистую пробирку, если это необходимо. Для получения информации о размере реакционных пробирок, обратитесь к инструкции по использованию прибора Abbott m2000sp. Не прикасайтесь к внутренней поверхности крышек при открывании пробирок.

2. Разморозьте контроли набора и внутренний контроль при температуре 15-30 °C или при 2-8 °C. Смотрите раздел КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА данного руководства.

• После размораживания контроли набора, внутренний контроль и калибраторы можно хранить при температуре 2-8 °C не более 24 часов.

• Перед использованием перемешайте каждый контроль на вортексе три раза в течение 2-3 секунд. Убедитесь, что в пробирках нет пузырей воздуха или пены. Если пузыри воздуха или пена присутствуют, удалите их, используя стерильный одноразовый наконечник. Убедитесь, что после перемешивания

содержимое каждой пробирки находится на дне пробирки, в противном случае постучите пробиркой о стол, чтобы сбросить содержимое на дно.

3. Разморозьте реагенты для амплификации при 15-30 °C или при 2-8 °C и храните их до использования при температуре 2-8 °C. Это необходимо сделать до завершения процесса выделения образцов.

Не перемешивайте реагенты для амплификации на вортексе!

- После размораживания реагенты для амплификации можно хранить при температуре 2-8 °C не более 24 часов.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для анализа 24 образцов используйте один флакон лизисного буфера *mLysis Buffer* и две пробирки с внутренним контролем. Каждый образец анализируется с каждой из трех реакционных смесей, приготавливаемых из реагентов набора «Abbott RealTime HCV Genotype II». Для анализа 24 образцов используйте по одной упаковке реагентов для амплификации А, В и С набора «Abbott RealTime HCV Genotype II».

Если Вы проводите автоматическое выделение образцов, с использованием прибора Abbott *m2000sp*, выполните этапы с 4 по 16.

При ручном выделении образцов следуйте инструкциям, представленным в соответствующем руководстве. (Руководство по ручному выделению образцов для их последующего анализа с помощью набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II»).

4. Перемешайте содержимое флаконов Abbott *mSample Preparation* осторожным переворачиванием. Если после в реагентах наблюдаются кристаллы, оставьте флаконы при комнатной температуре до их полного растворения. Не используйте реагенты до тех пор, пока кристаллы не растворятся полностью.
5. Перемешайте каждую пробирку с внутренним контролем на вортексе три раза в течение 2-3 секунд перед использованием.
6. Внесите 2000 мкл внутреннего контроля во флакон с лизисным буфером *mLysis Buffer*. **ДЛЯ ВНЕСЕНИЯ ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЯ ИСПОЛЬЗУЙТЕ ТОЧНО ОТКАЛИБРОВАННЫЕ ПИНЕТКИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ТОЛЬКО НА ЭТОМ ЭТАПЕ.** Перемешайте, аккуратно переворачивая флакон 5 – 10 раз, чтобы избежать сильного вспенивания.

7. Поместите пробирки с положительным контролем, отрицательным контролем и исследуемыми образцами в штативы для пробирок с образцами прибора Abbott *m2000sp*.
8. Поместите контейнеры для реагентов в специальный штатив.
9. Поместите штативы с реагентами Abbott *mSample Preparation* и глубоколоночный планшет Abbott 96 Deep-Well Plate на рабочий стол прибора Abbott *m2000sp*. Следуйте инструкциям, описанным в руководстве по работе с прибором Abbott *m2000sp*.
10. В окне «Выделение нуклеиновых кислот: Запуск реакции» выберите нужный протокол в зависимости от объема анализируемых образцов. Запустите протокол выделения нуклеиновых кислот, следуя инструкциям, описанным в руководстве по работе с прибором Abbott *m2000sp*. После завершения процесса экстракции нуклеиновых кислот, выделенные образцы могут находиться в глубоколоночном планшете до запуска протокола добавления реакционной смеси:

- при температуре 2 – 30 °C до 4 часов;
- при температуре –20 °C или ниже до 7 дней.

- Перед запуском протокола добавления реакционной смеси разморозьте выделенные образцы.

ПРИМЕЧАНИЕ: Перед началом работы с реагентами для амплификации смените перчатки.

11. После завершения процесса экстракции поместите на рабочий стол прибора Abbott *m2000sp* три упаковки реагентов для амплификации (А, В и С) и три пробирки для реакционной смеси. Поместите упаковки с реагентами для амплификации А, В и С в позиции 1, 2 и 3, соответственно.
- Каждая из трех упаковок с реагентами рассчитана на проведение 24 реакций.
 - Перед началом работы убедитесь, что реагенты полностью разморожены.
 - Убедитесь, что содержимое каждой пробирки находится на дне, в противном случае постучите пробиркой о стол, чтобы сбросить содержимое на дно.
 - Снимите с пробирок крышки и утилизируйте их.

12. В окне «Добавление реакционной смеси: Запуск реакции» выберите тот глубоколоночный планшет, который нужно проанализировать. Запустите протокол добавления реакционной смеси Abbott *m2000sp* Master Mix Addition protocol. Следуйте инструкциям, описанным в руководстве по работе с прибором Abbott *m2000sp*.

ПРИМЕЧАНИЕ: Протокол прибора *m2000rt* (этап 16) должен быть запущен в течение 90 минут после запуска протокола добавления реакционной смеси (этап 12).

Область амплификации

13. Включите и инициализируйте прибор Abbott *m2000rt*.

• **Примечание:** Прибор Abbott *m2000rt* должен прогреться в течение 15 минут.

Примечание: Прежде чем возвращаться в Область Приготовления Образцов, смените перчатки.

14. После завершения протокола добавления реакционной смеси в приборе Abbott *m2000sp*, поставьте реакционный планшет в специальный штатив (Splash Free Support Base).

15. Заклейте 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate в соответствии с инструкцией к прибору Abbott *m2000sp*, раздел Инструкции по работе с прибором. Запишите данные по постановке на компакт-диск или экспортируйте их на прибор Abbott *m2000rt*, используя специальный коммуникационный кабель.

16. Поместите заклеенный реакционный планшет в прибор Abbott *m2000rt*. Импортируйте данные по планшету, используя компакт-диск с ранее записанной информацией или специальный коммуникационный кабель. Следуйте указаниям инструкции по работе с прибором Abbott *m2000rt*, раздел Инструкции по работе с прибором, Импортирование данных.

Если Вы проводили выделение образцов вручную, следуйте дальнейшим инструкциям (этапы с 17 по 26).

17. Приготовьте реакционные смеси следующим образом:

- Каждая из трех упаковок с реагентами для амплификации «Abbott RealTime HCV Genotype II» рассчитана на проведение 24 реакций.
- Прежде, чем открывать пробирки с реагентами, убедитесь, что содержимое каждой из них находится на дне, в противном случае постучите пробиркой о стол, чтобы сбросить содержимое на дно.
- Приготовьте реакционные смеси, используя **ПИПЕТКИ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ТОЛЬКО ДЛЯ РАБОТЫ С РЕАГЕНТАМИ**, внеся 251 мкл Активирующего реагента (HCV Genotype II Activation Reagent) (Реагент 1) и 726 мкл Олигонуклеотидов HCV Genotype II Oligonucleotide Reagent (Реагент 2) в пробирки с термостабильной полимеразой (Реагент 3).

Реакционная смесь А	Реакционная смесь В	Реакционная смесь С
251 мкл Активирующего реагента	251 мкл Активирующего реагента	251 мкл Активирующего реагента
726 мкл Олигонуклеотидов HCV Genotype II Oligonucleotide Reagent Реагент А	726 мкл Олигонуклеотидов HCV Genotype II Oligonucleotide Reagent Реагент В	726 мкл Олигонуклеотидов HCV Genotype II Oligonucleotide Reagent Реагент С

18. Смешайте содержимое каждой пробирки с реакционной смесью, перевернув ее 5 раз, а затем перемешайте на вортексе, однократно, в течение 5 – 10 секунд. Убедитесь, что содержимое каждой из них находится на дне, в противном случае постучите пробиркой о стол, чтобы сбросить содержимое на дно.

19. Поместите 96-луночный реакционный планшет в охладитель (StrataCooler 96), следуйте инструкциям к охладителю.

20. Включите и инициализируйте прибор Abbott m2000rt в Области амплификации.

- **Примечание:** Прибор Abbott m2000rt должен прогреться в течение 15 минут.

Примечание: Прежде чем возвращаться в Область Приготовления Образцов, смените перчатки.

21. Используя **ПИПЕТКИ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ТОЛЬКО ДЛЯ РАБОТЫ С РЕАГЕНТАМИ**, внесите 40 мкл каждой реакционной смеси в реакционный планшет, следуя **ДИАГРАММЕ А**, представленной ниже. Сначала внесите реакционную смесь А, затем реакционную смесь В, а затем – реакционную смесь С. Для внесения каждой реакционной смеси во все лунки можно использовать один наконечник. Визуально проверьте количество жидкости в каждой лунке, убедитесь, что везде содержится 40 мкл смеси.

ДИАГРАММА А

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	А	В	С	А	В	С	А	В	С			
В	А	В	С	А	В	С	А	В	С			
С	А	В	С	А	В	С	А	В	С			
Д	А	В	С	А	В	С	А	В	С			
Е	А	В	С	А	В	С	А	В	С			
F	А	В	С	А	В	С	А	В	С			
G	А	В	С	А	В	С	А	В	С			
Н	А	В	С	А	В	С	А	В	С			

ПРИМЕЧАНИЕ: Протокол прибора *m2000rt* (этап 26) должен быть запущен в течение 90 минут после внесения реакционной смеси (этап 21).

22. Перенесите реакционный планшет в охладитель в Область Приготовления Образцов.

Примечание: Прежде чем возвращаться в Область Приготовления Образцов, смените перчатки.

Область приготовления образцов.

23. В области приготовления образцов внесите по 20 мкл элюата образцов в ячейки 96-луночного оптического реакционного планшета Abbott 96-Well Optical Reaction Plate, находящегося в кулере StrataCooler 96, следуйте **ДИАГРАММЕ В**, приведенной ниже. При внесении каждого образца используйте отдельный наконечник для пипетки. Во время переноса каждого образца смешайте компоненты реакции пипетированием 3-5 раз. Убедитесь, что в каждой лунке планшета находится 60 мкл жидкости.

ДИАГРАММА В

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	NC	NC	7	7	7	15	15	15			
B	PC	PC	PC	8	8	8	16	16	16			
C	1	1	1	9	9	9	17	17	17			
D	2	2	2	10	10	10	18	18	18			
E	3	3	3	11	11	11	19	19	19			
F	4	4	4	12	12	12	20	20	20			
G	5	5	5	13	13	13	21	21	21			
H	6	6	6	14	14	14	22	22	22			

24. Поставьте реакционный планшет в специальный штатив (Splash Free Support Base) и заклейте его в соответствии с инструкцией к прибору Abbott *m2000rt*.

Область амплификации

25. Центрифугируйте реакционный планшет, находящийся в специальном штативе при 5000 g в течение 5 минут.

26. Выберите нужный протокол исследования, соответствующий объему тестируемого образца и введите всю необходимую информацию по анализируемому планшету, следуя инструкции по работе с прибором Abbott *m2000rt*, раздел Инструкции по работе с прибором.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ПРИБОРЕ АБВОТТ *m2000rt*.

Подробные инструкции по работе с прибором Abbott *m2000rt* приведены в руководстве по его использованию, раздел Инструкции по работе с прибором.

1. Поместите 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate в прибор Abbott *m2000rt* и запустите протокол Abbott RealTime HCV Genotype II, следуя инструкциям по работе с данным прибором. Время исследования составляет приблизительно 2 часа 45 минут.
2. После того, как прибор Abbott *m2000rt* завершит выполнение протоколов амплификации и детекции, удалите реакционный планшет из прибора и утилизируйте его, следуя инструкциям, приведенным в разделе Меры предосторожности данного руководства.

ПРОЦЕДУРЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Удалите глубоколуночный планшет Abbott 96 Deep-Well Plate, реакционные пробирки, контейнеры для реагентов и пробирки для реакционной смеси с рабочего стола прибора Abbott *m2000sp* и утилизируйте их в соответствии с инструкцией к данному прибору.
2. Очистите охладитель StrataCooler 96 в соответствии с инструкцией к данному оборудованию и верните его в Область Приготовления Реагентов.
3. Поместите 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate в пластиковый контейнер и утилизируйте в соответствии с инструкцией к прибору Abbott *m2000rt* вместе с перчатками, используемыми при данной работе.
4. Очистите штатив для реакционного планшета Splash Free Support Base перед следующим использованием в соответствии с инструкцией к прибору Abbott *m2000rt*.
5. Если Вы проводили выделение нуклеиновых кислот вручную, обратитесь к разделу Очистка руководства по ручной пробоподготовке образцов для их последующего анализа с помощью набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II».

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Оптическая калибровка прибора Abbott *m2000rt*

Для подробного описания принципов проведения оптической калибровки прибора Abbott *m2000rt* обратитесь к разделу Калибровка инструкции по работе с прибором Abbott *m2000rt*.

Оптическая калибровка прибора Abbott *m2000rt* требуется для точного измерения флуоресценции и повышения разрешающей способности во время анализа с использованием набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II».

Для калибровки прибора Abbott *m2000rt* при проведении анализа с использованием набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» используются следующие Калибровочные планшеты Abbott *m2000rt* Optical Calibration Plates:

- Планшет, содержащий краситель FAM (Карбоксифлуоресцин)
- Планшет, содержащий краситель ROX (Карбокси-X-родамин)
- Планшет, содержащий краситель VIC® (Патентованный краситель)
- Планшет, содержащий краситель NED (Патентованный краситель)
- Планшет, содержащий краситель Cy5 (Цианин)

Выявление ингибирования

В начале процесса пробоподготовки в каждый образец и контроль вносится постоянное, строго определенное количество ВК, которое затем измеряется прибором Abbott *m2000rt*, свидетельствуя о правильности протекания процесса реакции и справедливости полученных результатов. ВК представляет собой последовательность РНК, неродственную последовательности HCV.

Средние значения циклов амплификации, при которых происходит детекция флуоресцентного сигнала последовательности ВК в отрицательном и положительном контролях, (IC C_i) рассматриваются как предельные значения достоверности результатов, с которыми сравниваются результаты всех образцов данной постановки.

В том случае, если результаты ВК, полученные при исследовании образца или контроля, не соответствуют указанным границам, появляется предупреждение об ошибке. Образцы, значения IC C_i которых превышают установленные границы, должны быть протестированы заново, начиная с этапа пробоподготовки. Для получения информации о предупреждениях, ошибках и способах их коррекции, обратитесь к разделу Результаты данного руководства и инструкции по использованию прибора *m2000rt*.

Отрицательный и положительный контроли

Для оценки достоверности результатов при каждой постановке реакции должны использоваться отрицательный и положительный контроли.

В том случае, если контрольные результаты не соответствуют допустимым, появляется информация об ошибке. Для получения информации о действиях, необходимых для коррекции такой ошибки, обратитесь к руководству по использованию прибора *m2000rt*. Если результаты анализа положительного или отрицательного контролей ошибочны, все образцы и контроли из данной постановки должны быть протестированы заново, начиная с момента пробоподготовки.

В отрицательном контроле не должно выявляться присутствие РНК HCV. Присутствие РНК HCV в отрицательном контроле указывает на контаминацию другими образцами или ранее амплифицированным продуктом, произошедшую во время приготовления образцов или во время подготовки 96-луночных оптических реакционных планшетов Abbott 96-Well Optical Reaction Plate. Для того чтобы избавиться от контаминации, произведите очистку приборов *m2000sp* и Abbott *m2000rt*, в соответствии с инструкциями, приведенными в руководствах по работе с указанным оборудованием, и повторите постановку образцов и контролей, следуя указаниям раздела Меры предосторожности данного руководства. Если отрицательный контроль продолжительное время остается реактивным, свяжитесь с представителем компании Abbott.

Мониторинг лаборатории на присутствие контаминации

Рекомендуется проводить данное тестирование как минимум один раз в месяц для мониторинга лаборатории на присутствие контаминации продуктами амплификации. Очень важно протестировать все области и оборудование лаборатории, которые могли подвергаться воздействию исследуемых образцов, контролей и/или амплифицированных продуктов, включая автоматические пипетки, рабочие поверхности приборов Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*, поверхность лабораторных столов, микроцентрифуги и адаптеры к центрифугам.

1. В свободную от РНаз микроцентрифужную пробирку объемом 1.7 мл, внесите 0.8 мл воды, свободной от РНаз.
2. Смочите ватную палочку водой из микроцентрифужной пробирки.
3. Используя смоченную ватную палочку, протрите исследуемую поверхность. Затем поместите ватную палочку в микроцентрифужную пробирку.
4. Покрутите погруженную в воду ватную палочку 10 раз и, слегка отжав, извлеките ее из воды. Утилизируйте ватную палочку.
5. Закройте пробирку и перемешайте ее содержимое на вортексе.
6. Внесите 0.5 мл буфера *mWash 1* в чистую пробирку, используя автоматическую пипетку, предназначенную для работы с внутренним контролем.
7. Внесите 20 мкл буфера *mWash 1* в каждую микроцентрифужную пробирку.
8. Закройте микроцентрифужную пробирку.
9. Протестируйте каждый образец в соответствии с разделом Процедура исследования данного руководства.
 - Перенесите жидкость из микроцентрифужной пробирки в реакционные пробирки, объемом 5 мл.
 - Доведите объем водой, свободной от РНаз, до 1.5 мл.
10. Присутствие контаминации определяется детекцией РНК HCV в исследуемых образцах.
11. Если обнаружено присутствие РНК HCV на лабораторном оборудовании, следуйте указаниям по очистке и деонтаминации, приводящимся в инструкциях по использованию данного оборудования. Если обнаружено присутствие РНК HCV на поверхностях лабораторных столов, промойте загрязненные участки 1.0%-ным раствором гипохлорита натрия, а затем 70%-ным этанолом или водой.

ВНИМАНИЕ: Растворы хлора могут разъедать лабораторное оборудование и металлы. Не используйте большие количества таких растворов или повторяйте обработку 70%-ным этанолом или водой до тех пор, пока остатки хлора станут невидимыми.

12. Повторите тестирование загрязненных областей, следуя пунктам 1 – 9.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Набор реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» основан на качественном определении нуклеиновых кислот вируса гепатита С. Контроли в данном Наборе используются для оценки достоверности полученных результатов.

В наборе реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» для точного определения каждого генотипа вируса гепатита С используются три критерия:

- Пороговый цикл (Ct).
- Различия в значениях пороговых циклов, т.е. сравнение значения порогового цикла при детекции вируса гепатита С в целом со значениями пороговых циклов при детекции каждого из генотипов HCV (1, 1a, 1b, 2, 3, 4, 5 и 6).
- Максимальная степень роста (MR).

Амплификационная кривая отражает изменения в интенсивности флуоресценции при протекании реакции ПЦР. Пороговый цикл – это цикл реакции ПЦР, на котором флуоресценция достигла определенного значения, превышающего некий базовый (пороговый) уровень. Для каждого образца, содержащего HCV, должно создаваться два значения Ct – одно, указывающее на присутствие вируса гепатита С независимо от его генотипа, и второе, характерное для конкретного генотипа.

Значение Ct, характерное для конкретного генотипа, рассматривается как истинное только в том случае, если оно не выходит за границы значений Ct, указывающих на присутствие вируса гепатита С независимо от генотипа.

Степень роста флуоресценции от цикла к циклу определяется кинетикой реакции ПЦР. Максимальное значение степени роста (MR) напрямую связано с эффективностью реакции ПЦР. Если значение MR выше, чем установленное, реакция амплификации является положительной. Если значение MR не достигает установленного, реакция амплификации является отрицательной. Определенный генотип выявляется в исследуемых образцах в тех случаях, когда значения Ct и MR превышают пороговые величины и когда значение Ct, специфичное для данного генотипа, не выходит за границы значений Ct, указывающих на присутствие вируса гепатита С независимо от генотипа (при исследовании одного и того же образца). Множественные генотипы определяются одновременно.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если контроли прошли успешно, можно переходить к интерпретации результатов. Прибор Abbott *m2000rt* автоматически выводит полученные результаты на экран. Результаты исследования и их интерпретация выглядят следующим образом:

Номер ячейки	Название образца	Тип образца	Результат	Интерпретация	Предупреждения (Flags)	Коды ошибок
A1	HCV-GT NEG	контроль	прошел			
B1	HCV-GT POS	контроль	прошел			
C1	PM1		1 1a			
D1	PM2		1 1b			
E1	PM3		РНК HCV не обнаружено			
F1	PM4		2			
G1	PM5		3			
H1	PM6		HCV all	Результат неопределенный		

Подробная информация о предупреждениях и кодах ошибок приводится в инструкции по работе с прибором Abbott *m2000rt*.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- **ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*.**
- Для оптимального проведения данного анализа требуется соблюдение рекомендаций по сбору образцов, их обработке и хранению (смотрите раздел **СБОР ОБРАЗЦОВ, ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА К МЕСТУ ИССЛЕДОВАНИЯ** данного руководства).
- Для исследования с помощью набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» могут быть использованы образцы плазмы или сыворотки крови, собранной в пробирки с ACD-A, CPD, калий-EDTA или натрий-EDTA. Использование других антикоагулянтов для работы с указанным Набором не валидировано.

- Исследование с помощью набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» должен проводить персонал, обученный работе на приборах Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*.
- Процедура данного анализа с использованием рекомендованных приборов сокращает риск контаминации амплифицированным продуктом. Однако, контаминация нуклеиновыми кислотами из положительных контролей и клинических образцов должна контролироваться в процессе работы, для чего необходима хорошая лабораторная практика и точное следование указаниям данного руководства.
- Образцы, в которых в ходе данного анализа не было выявлено присутствия вирусной РНК, не должны рассматриваться как не содержащие РНК HCV.
- Как в случае любого диагностического теста, результаты анализа с использованием набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» должны интерпретироваться в сочетании с другими клиническими и лабораторными показателями.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Точность

Точность анализа с применением набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» оценивалась по результатам тестирования 169 образцов, содержащих HCV генотипа 1 (110 образцов имели генотип 1a, 58 – генотип 1b и 1 – просто генотип 1), 41 образца с HCV генотипа 2, 27 – с генотипом 3, 18 – с генотипом 4, 14 – с генотипом 5 и 12 – с генотипом 6. Для определения точного генотипа каждого проанализированного образца проводилось секвенирование нуклеотидных последовательностей.

Исследование проводилось с использованием одного лота реагентов для амплификации набора «Abbott RealTime HCV Genotype II», одного лота внутреннего контроля, отрицательного контроля и положительного контроля, на одних и тех же приборах Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*.

Совпадение результатов секвенирования и исследования тех же образцов с помощью набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» составило 98.22% для всех проанализированных генотипов, 97.27% - для субтипа 1a и 96.55% - для субтипа 1b.

Результаты, характеризующие точность анализа с использованием набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II», представлены в Таблице 1.

Таблица 1.

Точность анализа с использованием инструментов *m2000sp* и *m2000rt*

Генотип/субтип HCV	Количество протестированных образцов	Количество правильно идентифицированных образцов	Процент выявления (%)
1 ^a	169	169	100.00
1a ^b	110	107	97.27
1b ^c	58	56	96.55
2	41	41	100.00
3	27	26	96.30
4	18	18	100.00
5	14	14	100.00
6	12	8	66.67
С 1 по 6 ^d	281	276	98.22

^a Данное значение включает в себя генотипы, определенные на приборе Abbott *m2000rt* как 1, 1a, 1b, 1/1a и 1/1b.

^b Три из 110 образцов генотипа 1a были идентифицированы как образцы генотипа 1, но не субтипа 1a.

^c Один образец, генотип которого был идентифицирован как 1b, был исключен из анализа, так как по результатам секвенирования его генотип был определен как 1. Из оставшихся 58 образцов генотипа 1b два были идентифицированы просто как генотип 1, а не субтип 1b.

^d Данное значение включает в себя генотипы 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

Перекрестная реактивность зондов, используемых для определения генотипов HCV

Последовательности зондов, используемых в наборе реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II», были проанализированы относительно последовательностей, содержащихся в базе данных <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/index>. Полученные результаты приведены в таблице, приведенной ниже.

Зонды	GT1, анализ 313 посл.	GT2, анализ 243 посл.	GT3, анализ 499 посл.	GT4, анализ 262 посл.	GT5, анализ 19 посл.	GT6, анализ 93 посл.
GT1	N/A	Перекрестная реактивность 1.2%*	Перекрестная реактивность 0.8%*	Перекрестная реактивность 1.9%*	Перекрестная реактивность не обнаружена	Перекрестная реактивность 52.6%*
GT2	Перекрестная реактивность не обнаружена	N/A	Перекрестная реактивность не обнаружена	Перекрестная реактивность не обнаружена	Перекрестная реактивность не обнаружена	Перекрестная реактивность не обнаружена
GT2v	Перекрестная	N/A	Перекрестная	Перекрестная	Перекрестная	Перекрестная

	реактивность не обнаружена		реактивность 1.4%	реактивность не обнаружена	реактивность не обнаружена	реактивность не обнаружена
GT3	Перекрестная реактивность 0.32%*	Перекрестная реактивность не обнаружена	N/A	Перекрестная реактивность не обнаружена	Перекрестная реактивность не обнаружена	Перекрестная реактивность не обнаружена
GT3v	Перекрестная реактивность 0.32%*	Перекрестная реактивность не обнаружена	N/A	Перекрестная реактивность не обнаружена	Перекрестная реактивность не обнаружена	Перекрестная реактивность не обнаружена
GT4	Перекрестная реактивность 1.9%*	Перекрестная реактивность 0.4%*	Перекрестная реактивность не обнаружена	N/A	Перекрестная реактивность не обнаружена	Перекрестная реактивность 1.0%*
GT5	Перекрестная реактивность 0.32%*	Перекрестная реактивность 0.8%*	Перекрестная реактивность не обнаружена	Перекрестная реактивность 1.9%*	N/A	Перекрестная реактивность не обнаружена
GT6	Перекрестная реактивность не обнаружена	Перекрестная реактивность не обнаружена	Перекрестная реактивность не обнаружена	Перекрестная реактивность не обнаружена	Перекрестная реактивность не обнаружена	N/A

*Процент выявленных изолятов.

Зонд, используемый в наборе реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» и направленный на область 5'-UTR HCV генотипа 1, не вызывает перекрестной реактивности с генотипом 6a, но с его помощью можно обнаруживать образцы с генотипом 6b, а также некоторые другие субтипы (не 6a/6b) генотипа 6. Образцы с генотипом 6 распространены в мире следующим образом. Наибольший процент образцов с генотипом 6 (39.1%) наблюдается в таких странах, как Таиланд, Индонезия, Мьянма, Вьетнам и некоторых районах Китая (Гонконг). За пределами этих регионов вирус гепатита С, имеющий генотип 6, выявляется значительно реже, с частотой от 1.8 – 3.2 % в Соединенных Штатах Америки до менее 1 % в Европе, на Среднем Востоке, в Африке, Азии (Япония, Корея, Филиппины, Индия, Австралия и Узбекистан) и Северной Америке.

Пределы детекции (LOD)

Предел детекции определяется как концентрация РНК HCV и точность определения генотипа HCV, выявляемые с вероятностью 95% или выше.

Предел детекции определялся тестированием панели образцов HCV различных генотипов, в концентрации 500 Международных единиц (МЕ)/мл. Каждый элемент панели представлял собой клинический образец, содержащий РНК HCV определенного генотипа в определенной концентрации, разведенный HCV-отрицательной плазмой крови человека до требуемой концентрации.

Исследование проводилось с использованием одного лота реагентов для амплификации набора «Abbott RealTime HCV Genotype II», одного лота внутреннего контроля, отрицательного контроля и положительного контроля, на трех различных системах Abbott m2000.

Предел детекции, объем исследуемого образца 0.5 мл

Предел детекции набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» – 500 МЕ/мл, в том случае, если используется 0.5 мл образца и праймеры/зонды данного Набора точно соответствуют нуклеотидным последовательностям анализируемых образцов.

Результаты, характеризующие аналитическую чувствительность набора реагентов «RealTime HCV Genotype II», представлены в Таблице 2.

Таблица 2.

Генотип/субтип HCV	Количество протестированных образцов	Количество правильно идентифицированных образцов	Процент выявления (%)
1 ^a	60	60	100.00
1a	30	30	100.00
1b	30	30	100.00
2	60	60	100.00
3	60	60	100.00
4	60	59	98.33
5	60	60	100.00
6	60	60	100.00
С 1 по 6 ^b	360	359	99.72

^aВ анализ были включены образцы с генотипами 1a и 1b.

^bВ анализ были включены образцы с генотипами 1 (1a и 1b), 2, 3, 4, 5 и 6.

Предел детекции, объем исследуемого образца 0.2 мл

Предел детекции набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» – 1.250 МЕ/мл, в том случае, если используется 0.5 мл образца и праймеры/зонды данного Набора точно соответствуют нуклеотидным последовательностям анализируемых образцов.

Все компоненты панели, выявленные в концентрации 500 МЕ/мл, были также определены при анализе 0.2 мл образца с вероятностью, превышающей или равной 95 %. Однако, пределом детекции при анализе 0.2 мл образца установлено значение 1.250 МЕ/мл из-за того, что в этом случае количество исследуемого образца в 2.5 раза меньше, чем при анализе 0.5 мл плазмы/сыворотки, пределом детекции которого является 500 МЕ/мл.

Результаты, характеризующие аналитическую чувствительность набора реагентов «RealTime HCV Genotype II», представлены в Таблице 3.

Таблица 3.

Генотип/субтип HCV	Количество протестированных образцов	Количество правильно идентифицированных образцов	Процент выявления (%)
1 ^a	60	60	100.00
1a	30	30	100.00
1b	30	30	100.00
2	65	65	100.00
3	60	60	100.00
4	60	60	100.00
5	60	60	100.00
6	64	64	100.00
С 1 по 6 ^b	369	369	100.00

^aВ анализ были включены образцы с генотипами 1a и 1b.

^bВ анализ были включены образцы с генотипами 1 (1a и 1b), 2, 3, 4, 5 и 6.

Детекция образцов, инфицированных смесью HCV различных генотипов

Способность набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» выявлять смешанные генотипы HCV была продемонстрирована исследованием панели из 30 HCV-позитивных образцов в различных комбинациях концентрации различных генотипов вируса [1:1 ($1 \times 10^6 : 1 \times 10^6$ МЕ/мл), 1:10 ($1 \times 10^5 : 1 \times 10^6$ МЕ/мл) и 1:100 ($1 \times 10^4 : 1 \times 10^6$ МЕ/мл)]. Каждый образец данной панели был проанализирован в трех повторностях.

Набор реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» требует проведения трех отдельных реакций для точного определения генотипов 1, 2, 3, 4, 5 и 6, а также субтипов 1a и 1b. Выбранная панель была протестирована также на выявление смешанных инфекций внутри каждой реакции (например, генотипов 1a и 3 в Реакции А, генотипов 1b и 2 в Реакции В, генотипов 4 и 5 в Реакции С), и выявление смешанных инфекций в различных реакциях (генотипа 1a в Реакции А и генотипа 2 в Реакции В, генотипа 2 в Реакции В и генотипа 5 в Реакции С, генотипа 1a в Реакции А и генотипа 5 в Реакции С).

Исследование проводилось с использованием одного лота реагентов для амплификации набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II», одного лота внутреннего контроля, отрицательного контроля и положительного контроля, на трех различных системах Abbott m2000 (приборах Abbott m2000sp и Abbott m2000rt).

С помощью набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» удалось определить оба генотипа в смешанных образцах 18 раз из 18 проведенных исследований при соотношении концентраций 1:1, 31 раз из 36 проведенных

исследований – при соотношении 1:10 и 25 раз из 36 проведенных исследований – при соотношении 1:100.

Потенциально интерферирующие вещества

Оценивалась чувствительность набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» к интерференции возрастающими количествами эндогенных веществ. Были протестированы HCV-отрицательные образцы и образцы, содержащие 10,000 МЕ/мл РНК HCV генотипа 2.

При исследовании с использованием набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» всех положительных и отрицательных образцов интерференция не наблюдалась в присутствии следующих веществ:

Гемоглобин	500 мг/дл
Триглицериды	3000 мг/дл
Билирубин	20 мг/дл
Белок	9 г/дл

Противовирусные препараты и антибиотики в концентрациях, превышающих их максимальные уровни в плазме или сыворотке, были протестированы в пяти пулах. При исследовании с использованием набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» всех HCV-положительных и HCV-отрицательных образцов интерференция не наблюдалась в присутствии следующих пулов лекарственных препаратов:

Пул	Протестированные лекарства
1	Зидовудин (Zidovudine), Саквинавир (Saquinavir), Ритонавир (Ritonavir), Азитромицин (Azithromycin), Интерферон 2a (Interferon 2a), Интерферон (Interferon 2b)
2	Сульфат абакавира (Abacavir sulfate), Ампренавир (Amprenavir), Пегинтерферон альфа-2a (Peginterferon alpha-2a), Рибавирин (Ribavirin), Пегинтерферон альфа-2b (Peginterferon alpha-2b)
3	Тенофовир дисопороксила фумарат (Tenofovir disoproxil fumarate), Ламивудин (Lamivudine), Ганцикловир (Ganciclovir), Индинавир сульфат (Indinavir sulfate), Ацикловир (Acyclovir), Валганцикловир гидрохлорид (Valganciclovir hydrochloride)
4	Ставудин (Stavudine), Диданозин (Didanosine), Лопинавир (Lopinavir), Энтекавир (Entecavir),

Ципрофлоксацин (Ciprofloxacin)

- 5 Адефовир (Adefovir), Невирапин (Nevirapine),
Нелфинавир (Nelfinavir), Энфувиртид (Enfuvirtide),
Валацикловир (Valacyclovir)

Специфичность

Специфичность анализа с использованием набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» определялась по результатам тестирования 100 серонегативных по HCV образцов плазмы крови.

Исследование проводилось с использованием одного лота реагентов для амплификации набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II», одного лота внутреннего контроля, отрицательного контроля и положительного контроля, на двух различных системах Abbott *m2000* (приборах Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*).

Все отрицательные образцы были определены набором реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» как не содержащие РНК HCV, что свидетельствует о 100%-ной (100/100) специфичности анализа (95% CI 96.38 – 100.00% на основе биномиального распределения).

Перекрестная реактивность

Перекрестная реактивность при исследовании с помощью набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» определялась в отношении вирусов и микроорганизмов, перечисленных ниже. Очищенные нуклеиновые кислоты или вирусные лизаты каждого микроорганизма были внесены в HCV-отрицательные образцы плазмы и образцы, содержащие 10,000 МЕ/мл РНК HCV генотипа 1.

Исследование проводилось с использованием одного лота реагентов для амплификации набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II», одного лота внутреннего контроля, отрицательного контроля и положительного контроля, на двух различных системах Abbott *m2000* (приборах Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*).

Вирус Иммунодефицита человека 1
Вирус Иммунодефицита человека 2*
Вирус Т-лимфоцитов человека 1
Вирус гепатита В
Вирус Эпштейна-Барра
Вирус простого герпеса 1
Вирус простого герпеса 2
Цитомегаловирус

Вирус Vaccinia
Полиомавирус человека ВК
Вирус папилломы человека 16
Вирус папилломы человека 18
Neisseria gonorrhoeae
Chlamydia trachomatis
Candida albicans
Staphylococcus aureus

Вирус герпеса человека 6В
Вирус герпеса человека 8
Вирус Варицелла-Зостер
*Вирусный лизат ВИЧ-2

Staphylococcus epidermidis
Флавивирус
Mycobacterium smegmatis

Во всех положительных и отрицательных образцах при проведении исследования с использованием набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» не наблюдалось интерференции в присутствии указанных вирусов и микроорганизмов.

Сравнительный анализ различных вариантов проведения исследования

Работа с набором реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II» может осуществляться четырьмя различными вариантами:

- Автоматическое выделение образцов из объема 0.2 мл, приготовление реакционной смеси и запуск протокола для анализа готового ПЦР-планшета с использованием системы Abbott *m2000*;
- Автоматическое выделение образцов из объема 0.5 мл, приготовление реакционной смеси и запуск протокола для анализа готового ПЦР-планшета с использованием системы Abbott *m2000*;
- Ручное выделение образцов из объема 0.2 мл, приготовление реакционной смеси и запуск протокола для анализа готового ПЦР-планшета;
- Ручное выделение образцов из объема 0.5 мл, приготовление реакционной смеси и запуск протокола для анализа готового ПЦР-планшета.

В двух репрезентативных исследованиях была проанализирована панель образцов, содержащих генотипы 1/1a, 1/1b, 2a/c, 2v, 3, 3v, 4, 5 и 6, приготовленная в концентрациях 500 МЕ/мл и/или 10.000 МЕ/мл.

Исследование проводилось с использованием одного лота реагентов для амплификации набора реагентов «Abbott RealTime HCV Genotype II», одного лота внутреннего контроля, отрицательного контроля и положительного контроля, на трех различных системах Abbott *m2000* (приборах Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*).

Результаты проведенного исследования с использованием автоматического и ручного процессов выделения образцов, приготовления реакционной смеси и запуска протоколов для анализа готовых ПЦР-планшетов показали, что идентичность определения генотипов HCV при разных вариантах анализа составляет более 95%.

ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Clarke B. Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 1997;78:2397-410.
2. Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42:962-73.
3. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *J Hepatology* 1999;30:956-61.
4. NIH Consensus and State-of-the-Science Statements. Management of Hepatitis C: 2002;19(3):1-46.
5. Myers TW, Gelfand DH. Reverse Transcription and DNA Amplification by a *Thermus thermophilus* DNA Polymerase. *Biochem* 1991;30:7661-6.
6. Higuchi R., Dollinger G., Walsh, PS, et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992;10:413-417.
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens.
8. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Fourth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, May 1999.
9. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual, 3rd edition. Geneva: World Health Organization, 2004.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline - Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: CLSI, 2005.
11. CDC. Guidelines for the prevention of human immunodeficiency virus and hepatitis B virus to health-care and public-safety workers. *MMWR* 1989;38(S-6):16S.
12. Schulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, et al. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Envir Microbiol* 1981;42(5):762-7.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline-Second Edition. NCCLS Document GP5-A2. Wayne, PA: NCCLS, 2002;22(3):1-23, 32-44.
14. US Environmental Protection Agency. EPA Guide for Infectious Waste Management Publication No. EPA/530-SW-86-014. Washington, DC: US Environmental Protection Agency, 1986:1-1-5-5, R1-R3, A1-A24.
15. Davis GL, Lau, JY, Urdea MS, et al. Quantitative detection of hepatitis C virus RNA with a solid-phase signal amplification method: Definition of optimal conditions for specimen collection and clinical application in interferon-treated patients. *Hepatology* 1994(6):1337-41.
16. Cuypers HTM, Bresters, D, Winkel IN, et al. Storage conditions of blood samples and primer selection affect the yield of cDNA polymerase chain reaction products of hepatitis C virus. *J Clin Micro* 1992;30(12):3220-4.

Данный продукт не предназначен для анализа или скрининга смешанных образцов, т.е., образцов, собранных более чем от одного пациента, или какого-либо иного скрининга крови или плазмы. Лицензия на использование данного продукта получена от компании Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc., его использование защищено следующими патентами США: 5,714,596; 5,712,088; 5,863,719; 5,372,928; 5,851,759; 6,074,816 и их зарубежными эквивалентами.

ПОКУПАТЕЛЬ ДАННОГО ПРОДУКТА МОЖЕТ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ЕГО ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ДЕТЕКЦИИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В РАМКАХ ДИАГНОСТИКИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*. НИКАКИЕ ПАТЕНТЫ ИЛИ ДРУГИЕ ЛИЦЕНЗИИ КАКОГО-ЛИБО РОДА, ЗА ИСКЛЮЧЕНИЕМ ДАННОЙ, НЕ ДАЮТ ПОКУПАТЕЛЮ НИКАКИХ ИНЫХ ПРАВ, КРОМЕ ПРАВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОДУКТА, ПРЕДОСТАВЛЯЕМОГО ПО ФАКТУ ЕГО ПОКУПКИ. ДАННОЕ УСЛОВИЕ НЕ ПРЕПЯТСТВУЕТ ВОЗМОЖНОСТИ ПЕРЕПРОДАЖИ ДАННОГО ПРОДУКТА.

Abbott m2000, m2000sp, m2000rt являются торговыми марками компании Abbott Laboratories.

Applera и Spirit design являются торговыми марками компании Celera и зарегистрированными торговыми марками компании Applera Corporation или ее дочерних компаний в США и некоторых других странах.

Armored RNA (РНК, обработанная белками) – это запатентованная технология, разработанная совместно компаниями Ambion, Inc. и Cenetron Diagnostics, LLC., патенты США #5,677,124, #5,919,625, #5,939,262, и патентами, находящимися на рассмотрении.

Armored RNA является зарегистрированной торговой маркой компании Ambion.

MGB является торговой маркой компании Nanogen Inc.

ProCline является зарегистрированной торговой маркой компании Rohm and Haas.

StrataCooler является зарегистрированной торговой маркой компании Stratagene.

RAM, ROX и NED являются торговыми марками компании Applera Corporation или ее дочерних компаний в США и/или некоторых других странах.

VIC является зарегистрированной торговой маркой компании Applera Corporation или ее дочерних компаний в США и/или некоторых других странах.

Sy5 является зарегистрированной торговой маркой компании GE Healthcare.

Компания Abbott Molecular Inc. является официальным производителем следующих реагентов:

Реагентов для амплификации Abbott RealTime HCV Genotype II Amplification Reagent Kit (List No. 8K24-90) и набора контролей Abbott RealTime HCV Genotype II Control Kit (List No. 8K24-80).

www.abbottmolecular.com

Abbott Molecular Inc.

Des Plaines, IL 60018 USA

