

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г № _____

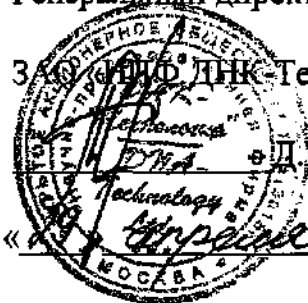
УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «ФДП ДНК-Технология»

Д.Ю.Трофимов

«_____» _____ 2008 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК

вируса гепатита С (HCV) и его генотипирования

методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

(ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП предназначен для выявления РНК вируса гепатита С (Hepatitis C virus) и его генотипирования методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

1.2. Набор может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике для диагностики вируса гепатита С и наиболее распространенных на территории России генотипов HCV (1a, 1b, 2 и 3a/3b) *in vitro*.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ.

Набор реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

Внутренний контрольный образец, представляющий собой стабилизированный фрагмент РНК, добавляется в исследуемый образец на стадии выделения нуклеиновых кислот и предназначен для оценки качества всех этапов исследования.

В наборе реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП в реакционную смесь введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами.

ДНК-зонды, использующиеся для детекции продуктов амплификации искомой нуклеиновой кислоты (НК) и внутреннего контрольного образца (ВК), мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации кДНК вируса гепатита С и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР следует использовать детектирующие амплификаторы.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в амплификационную смесь происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

2.2 СОСТАВ НАБОРА.

Набор состоит из трех комплектов реагентов:

а) комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот («Проба-НК»), включает:

- лизирующий раствор, 15 мл 1 флакон;
- реагент для преципитации, 20 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №1, 25 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №2, 15 мл 1 флакон;
- буфер для растворения, по 1,25 мл 2 пробирки;
- отрицательный контрольный образец (К-), 1,5 мл 1 пробирка;
- внутренний контрольный образец (РНК-ВК), 500 мкл 1 пробирка.
- внутренний контрольный образец (ДНК-ВК), 500 мкл 1 пробирка.

Примечание: При хранении допускается выпадение небольшого количества осадка в лизирующем растворе, который растворяется прогреванием лизирующего раствора при 65 °С.

б) комплект реагентов для обратной транскрипции РНК включает:

- буферный раствор для обратной транскрипции «ОТ-буфер», 100 мкл 1 пробирка;

- смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) и праймера для обратной транскрипции «праймер ОТ-HCV+дНТФ», 50 мкл 1 пробирка;

- обратную транскриптазу, 25 мкл 1 пробирка;

в) комплект реагентов для ПЦР-амплификации включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином:

- «Вirus гепатита С (HCV), HCV-общий» - 50 пробирок (по 20 мкл);

- «Вirus гепатита С (HCV), 1a тип» - 50 пробирок (по 20 мкл);

- «Вirus гепатита С (HCV), 1b тип» - 50 пробирок (по 20 мкл);

- «Вirus гепатита С (HCV), 2 тип» - 50 пробирок (по 20 мкл);

- «Вirus гепатита С (HCV), 3a/3b тип» - 50 пробирок (по 20 мкл);

- буферный раствор «ПЦР-буфер» - 5 пробирок (по 500 мкл);

- минеральное масло - 5 пробирок (по 1,0 мл);

- Taq-полимеразу – 2 пробирки (по 50 мкл) и 1 пробирка (25 мкл);

- положительные контрольные образцы (К+):

- «HCV-общий», 75 мкл 1 пробирка;

- «HCV, 1a тип», 75 мкл 1 пробирка;

- «HCV, 1b тип», 75 мкл 1 пробирка;

- «HCV, 2 тип», 75 мкл 1 пробирка;

- «HCV, 3a/3b тип», 75 мкл 1 пробирка.

В состав смеси для амплификации входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентные ДНК-зонды.

Для удобства потребителей в комплект реагентов для ПЦР-амплификации дополнительно включены 4 запасные пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином.

2.3 Время проведения анализа - 5 ч.

2.4 Набор рассчитан на проведение 50 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 В образцах плазмы крови человека, содержащих РНК вируса гепатита С генотипов 1a, 1b, 2, 3a/3b, после проведения реакций обратной транскрипции и амплификации детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции для соответствующего генотипа HCV и для специфического продукта «HCV-общий».

3.2 В образцах плазмы крови человека, содержащих РНК вируса гепатита С иных генотипов (не указанных в п.3.1), после проведения реакций обратной транскрипции и амплификации детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции для специфического продукта «HCV-общий» и отсутствие экспоненциального роста уровня флуоресценции для всех 4 генотипов, предложенных в данном наборе.

3.3 В образцах плазмы крови человека, не содержащих РНК гепатита С, результат исследования должен быть отрицательным.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Меры предосторожности - соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и

личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.2 Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.3 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.4 Работать с набором в одноразовых резиновых перчатках без талька.

4.5 При работе с набором следует использовать только новые наконечники и пробирки.

4.6 Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов крови.

4.7 Выделение НК следует проводить в ламинарных шкафах с включенным ламинарным потоком. Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.

4.8 Для предотвращения контаминации, этапы выделения РНК, обратной транскрипции, ПЦР и детекции следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

4.9 Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

4.10 Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.11 Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

4.12 Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.2.731-99. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.

4.13 Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.1888-04.

При работе с набором реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор детектирующий ДТ-322 или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»), iCycler iQ (Bio-Rad) или аналоги;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный на 40-95 °С;
- микроцентрифуга/вортекс со скоростью вращения 1000-3000 об/мин;

- насос с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объемом 1,5 мл; 2,5 мл;
- пипетки автоматические одноканальные с переменным объемом: 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для автоматических пипеток с маркировкой "RNAase-free, DNAase-free" объемом 1-20 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские;
- контейнер с дезинфицирующим раствором.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 ВЗЯТИЕ ОБРАЗЦОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Взятие крови проводится в пластиковые пробирки объемом 2,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2-3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.2 ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

ВНИМАНИЕ! Время от взятия материала до получения плазмы не должно превышать 6 часов.

Транспортировать и хранить образцы крови до начала исследования при 2-8 °С.

6.3 ПОЛУЧЕНИЕ ПЛАЗМЫ

6.3.1 Пробирки с кровью центрифугировать при 3000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

6.3.2 После центрифугирования отобрать автоматической пипеткой верхнюю фракцию (плазма) и перенести в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

Полученная плазма готова для выделения НК.

При необходимости хранить полученную плазму при температуре минус 20 °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание: Для генотипирования можно использовать кДНК, полученную при работе с наборами реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С и ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный. В этом случае необходимо выполнить пп.7.2.8-7.2.9 (разведение кДНК буфером для растворения) и п.7.3 («Проведение полимеразной цепной реакции»).

7.1 ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Примечание. Перед началом работы достать из холодильника комплект реагентов для выделения НК и проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе. В случае выпадения осадка, лизирующий раствор прогреть при 65 °С до полного растворения осадка.

ВНИМАНИЕ! На данном этапе используйте только наконечники с маркировкой "RNAase-free, DNAase-free".

7.1.1 Промаркировать необходимое количество новых пластиковых пробирок объемом 1,5 мл с учетом пробирок для отрицательного контрольного образца «К-».

7.1.2 Внести по 10 мкл внутреннего контрольного образца (РНК-ВК) в каждую пластиковую пробирку.

7.1.3 Внести по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.

7.1.4 Добавить в пробирки для исследуемых образцов 100 мкл исследуемого образца (плазмы крови). В пробирку, промаркированную «К-», добавить 100 мкл отрицательного контрольного образца.

7.1.5 Плотно закрыть крышки пробирок, перемешать на вортексе в течение 3-5 с и осадить капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с.

7.1.6 Термостатировать исследуемые образцы и «К-» при 65 °С в течение 15 мин, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с.

7.1.7 Добавить 400 мкл реагента для преципитации, перемешать на вортексе в течение 3-5 с.

7.1.8 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

7.1.9 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

7.1.10 Добавить к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.

7.1.11 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

7.1.12 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

7.1.13 Добавить к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.

7.1.14 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

7.1.15 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

7.1.16 Открыть крышки пробирок и высушить осадок при 65 °С в течение 5 мин.

7.1.17 Добавить к осадку 16,5 мкл буфера для растворения, встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с, осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3-5 с.

7.1.18 прогреть пробирки при 65 °С в течение 10 мин

7.1.19 Осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

Полученный препарат РНК необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции, так как препарат РНК не подлежит хранению.

7.2 ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

7.2.1 Разморозить содержимое пробирок ОТ-буфер и «праймеры ОТ-НСV и дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при 18-25 °С, затем

тщательно перемешать на вортексе и осадить капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с.

7.2.2 В отдельной пластиковой пробирке приготовить ОТ-смесь путем смешивания ОТ-буфера, «праймер ОТ-НСV и дНТФ» и обратной транскриптазы:

- 2,0х(N+1) мкл ОТ-буфера,
- 1,0х(N+1) мкл «праймер ОТ-НСV и дНТФ»,
- 0,5х(N+1) мкл обратной транскриптазы,

где N+1 – количество анализируемых на наличие РНК НCV образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.

ВНИМАНИЕ! Обратную транскриптазу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше времени.

7.2.3 Перенести пробирки в помещение для выделения НК.

7.2.4 По 3,5 мкл ОТ-смеси внести в пробирки с выделенным образцом НК и в пробирку «К-», прошедший этап выделения НК.

7.2.5 Пробирки встряхнуть на вортексе в течение 3-5 с и осадить капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с.

7.2.6 Пробирки поместить в термостат и инкубировать при температуре 40 °С в течение 30 мин, затем при температуре 95 °С в течение 5 мин.

7.2.7 Осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с.

7.2.8 К полученной кДНК добавить 10 мкл буфера для растворения из комплекта для выделения нуклеиновых кислот.

7.2.9 Пробирки встряхнуть на вортексе в течение 3-5 с и осадить капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3-5 с.

Препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

Примечание. При необходимости допускается хранение кДНК при температуре минус 20 °С не более 1 мес.

Для каждого препарата кДНК возможно проведение исследования на наличие 4 генотипов (1a, 1b, 2, 3a/3b) вируса гепатита С. Для исследования на каждый генотип необходимо применять соответствующий комплект для ПЦР-амплификации.

«НСV-общий» - комплект реагентов для выявления вируса гепатита С, служит дополнительным контролем наличия/отсутствия РНК вируса гепатита С в исследуемом образце. Внимание! При исследовании кДНК, полученной при работе с наборами реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С и ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный, комплект «НСV-общий» не используется.



Рисунок 1. Исследование на выявление НCV и его генотипирования

7.3 ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

7.3.1 Разморозить при комнатной температуре (18-25 °С) ПЦР-буфер из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации, затем тщательно перемешать на

вортексе и осадить капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с.

7.3.2 Промаркировать необходимое количество пробирок из каждого комплекта со смесью для амплификации, запечатанной парафином (1a тип, 1b тип, 2 тип, 3a/3b тип и «HCV-общий»*): для исследуемых образцов, положительного контрольного образца «K+» и отрицательного контрольного образца «K-».

Например. Для исследования пяти образцов необходимо всего промаркировать 35 пробирок: по 7 пробирок из каждого комплекта со смесью для амплификации, из них 5 пробирок для исследуемых образцов и по одной пробирке для «K+» и «K-».

Таблица 1. Маркировка пробирок для исследования пяти образцов.

Тест № образца	1a тип	1b тип	2 тип	3a/3b тип	HCV-общий*
1	✓	✓	✓	✓	✓
2	✓	✓	✓	✓	✓
3	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓	✓
5	✓	✓	✓	✓	✓
K-	✓	✓	✓	✓	✓
K+	✓	✓	✓	✓	✓

* - При генотипировании кДНК, полученной при работе с комплектами реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С и ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный, комплект «HCV-общий» не используется в исследовании.

7.3.3 В отдельной пластиковой пробирке, предварительно перемешав реагенты, приготовить смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой:

- 10x(N+1) мкл ПЦР-буфера,
- 0,5x(N+1) мкл Taq-полимеразы,

где N+1 - количество анализируемых образцов с учётом «К-» и «К+» (N) с запасом на 1 образец.

ВНИМАНИЕ! Таq-полимеразу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше времени.

Смесь можно хранить при комнатной температуре не более 1 ч.

7.3.4 Перемешать приготовленную смесь ПЦР буфера с Таq-полимеразой на вортексе и осадить капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с.

7.3.5 Во все амплификационные пробирки, не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл тщательно перемешанной смеси ПЦР-буфера с Таq-полимеразой.

7.3.6 В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла, закрыть пробирки.

7.3.7 Пробирки перенести в рабочую зону, предназначенную для выделения нуклеиновых кислот.

7.3.8 Внести в амплификационные пробирки (кроме пробирок «К-», «К+»), не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК.

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы кДНК в амплификационные пробирки наконечниками с фильтрами.

7.3.9 В пробирки, промаркированные «К-», внести по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК и обратную транскрипцию. В пробирку, маркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.3.10 Центрифугировать пробирки при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с.

7.3.11 Установить все пробирки в детектирующий амплификатор и провести ПЦР в режиме, приведенном в таблицах 2-3, с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл.

Таблица 2. Режим амплификации для детектирующего амплификатора ДТ-322 или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °C 94 °C	1 мин 1 мин	1
2.	94 °C 62 °C*	10 с 20 с	50
3.	10 °C	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 3. Режим амплификации для амплификатора iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Режим для dynamicwf.tmo			
№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °C 94 °C	30 с 60 с	1
2.	94 °C 62 °C	20 с 30 с	5
3.	80 °C*	20 с	2
Режим амплификации			
1.	94 °C 62 °C*	10 с 20 с	45
2.	10 °C	Хранение	

*- регистрация результатов

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов, свяжитесь с представителем компании для уточнения программы амплификации.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА ДТ-322 ИЛИ ДТ-96

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство по эксплуатации» для ДТ-322 или ДТ-96).

8.2 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА iCYCLER iQ (BIO-RAD Laboratories)

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство пользователя» для iCycler iQ).

9. ПРОВЕДЕНИЕ ДЕТЕКЦИИ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР

9.1 Детекция, учет и интерпретация результатов осуществляется на приборах ДТ-322 или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология») или iCycler iQ (Bio-Rad) автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 В образцах крови, содержащих РНК вируса гепатита С определенного генотипа, после проведения реакций обратной транскрипции и амплификации,

детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции для специфического продукта (одного из 4-х генотипов HCV, предложенных в наборе, и «HCV-общего»).

9.3 В образцах, не содержащих РНК гепатита С, детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции внутреннего контрольного образца и отсутствие экспоненциального роста кривой для специфического продукта («HCV-общего» и всех 4-х генотипов).

9.4 В случае отсутствия экспоненциального роста уровня флуоресценции для специфического продукта («HCV-общего» и всех 4-х генотипов) и для внутреннего контрольного образца, результат оценивается как недостоверный.

9.5 При получении экспоненциального роста уровня флуоресценции по двум генотипам (например, генотипы 1a и 1b) на одном образце с интервалом по Ct более 3-х циклов, положительным считать сигнал с наименьшим значением Ct (1b), а сигнал с большим значением Ct (1a) считать перекрестной неспецифической реакцией (рис.2).

9.6 Необходимо учитывать, что для вируса гепатита С характерен высокий полиморфизм, обуславливающий большое разнообразие генотипов и субтипов. Поэтому экспоненциальный рост уровня флуоресценции для специфического продукта «HCV-общий» и отсутствие экспоненциального роста уровня флуоресценции для всех предложенных в наборе 4-х генотипов, может свидетельствовать о наличии других генотипов HCV в исследуемом образце (например, генотипы 4, 5 и 6).

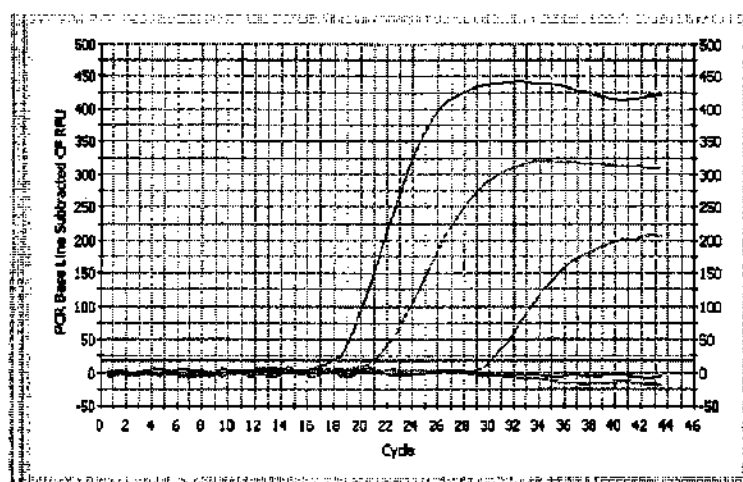


Рисунок 2. Экспоненциальный рост уровня флуоресценции по нескольким генотипам: выявлен генотип 1b.

Таблица 4. Сводная таблица по учету и интерпретации результатов проведенного исследования

Экспоненциальный рост уровня флуоресценции			Интерпретация результата исследования
Один из генотипов HCV (1a, 1b, 2, 3a/3b)	HCV-общий	Внутренний контроль	
+	+	Не учитывается	Обнаружена РНК вируса гепатита С генотипа
-	-	+	РНК вируса гепатита С не обнаружена
-	-	-	Результат недостоверный
-	+	Не учитывается	Обнаружена РНК вируса гепатита С, тип не идентифицирован

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Срок годности набора – 6 мес.

10.2 Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности.

10.3 Комплект реагентов для выделения НК, пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации следует хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности набора.

10.4 Смесью ПЦР-буфера с Taq-полимеразой следует хранить при температуре 18-25 °С не более 1 ч.

10.5 Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.6 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП, следует обращаться в ЗАО «НПФ ДНК-Технология» по адресу:

115478, Москва, Каширское ш., д. 23-5, офис 16

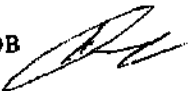
телефон/факс (495) 980-45-55

Ведущий научный сотрудник
ЗАО «НПФ ДНК-Технология»,
кандидат биологических наук

 Т.В.Петрова
«17» сентября 2008 г

«СОГЛАСОВАНО»

Заведующий КДЛ
Московского областного центра
по профилактике и борьбе со СПИД
и инфекционными болезнями

И.Л.Серков 
«19» мая 2008 г