



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

Регистрационное удостоверение МЗ СР РФ
ФСР 2009/04071

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

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 в образцах плазмы крови методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР).
- 1.2.** Набор реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике для диагностики вируса гепатита С и наиболее распространённых 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. 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 смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае

образования специфического продукта ДНК-зонд разрушается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами.

ДНК-зонды, используемые 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 слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв 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 трёх комплектов:

1. Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот включает:

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

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

2. Комплект реагентов для обратной транскрипции РНК включает:

- буферный раствор для обратной транскрипции «ОТ-буфер» – 1 пробирка (100 мкл);
- смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) и праймеров для обратной транскрипции «Праймеры ОТ-типирование HCV+дНТФ» – 1 пробирка (50 мкл);
- обратную транскриптазу – 1 пробирка (25 мкл).

3. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином:
 - «Вирус гепатита С (HCV), HCV-общий» – 48 пробирок (по 20 мкл);
 - «Вирус гепатита С (HCV), 1a тип» – 48 пробирок (по 20 мкл);
 - «Вирус гепатита С (HCV), 1b тип» – 48 пробирок (по 20 мкл);
 - «Вирус гепатита С (HCV), 2 тип» – 48 пробирок (по 20 мкл);
 - «Вирус гепатита С (HCV), 3a/3b тип» – 48 пробирок (по 20 мкл);
- Таq полимеразу – 1 пробирка (150 мкл);
- буферный раствор «ПЦР буфер» – 3 пробирки (по 1,0 мл);
- минеральное масло – 6 пробирок (по 1,0 мл);
- буфер для растворения – 1 пробирка (1,25 мл);
- положительные контрольные образцы («К+»):
 - «HCV-общий» – 1 пробирка (75 мкл);
 - «HCV, 1a тип» – 1 пробирка (75 мкл);
 - «HCV, 1b тип» – 1 пробирка (75 мкл);
 - «HCV, 2 тип» – 1 пробирка (75 мкл);
 - «HCV, 3a/3b тип» – 1 пробирка (75 мкл).

В состав смеси для амплификации входят: ПЦР-буфер,

дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентные ДНК-зонды.

2.3. Время проведения анализа – 5 ч.

2.4. Набор рассчитан на проведение 48 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ 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 вируса гепатита С, результат исследования должен быть отрицательным.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Мерами предосторожности при работе с комплектом реагентов является 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 2Б (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 нуклеиновых кислот следует проводить в ламинарных шкафах с включённым ламинарным потоком. Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.
- 4.8. Для предотвращения контаминации этапы выделения РНК, обратной транскрипции и ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабжённых комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.
- 4.9. Всё 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 51609–2000. 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 окончания работ в течение 1 часа.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569-09.

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

- амплификатор детектирующий ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»), iCycler iQ (Bio-Rad) или аналоги;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 40–95°C;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- микроцентрифуга/вортекс;
- насос с колбой-ловушкой для удаления надсадочных жидкостей;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл, 2,5 мл;
- пипетки автоматические одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости: 0,5–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для автоматических пипеток с маркировкой «RNase-free, DNase-free» объёмом 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 объёмом 2,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2–3 раза.

В качестве антикоагулянта допускается также

использование цитрата натрия.

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°C.

6.3. Получение плазмы

6.3.1. Пробирки с кровью центрифугируйте при 3000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре (18–25°C).

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

Полученная плазма готова для выделения НК.

При необходимости хранить полученную плазму при температуре минус 20°C 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 (ООО «НПО ДНК-Технология»). В этом случае необходимо выполнить п.п. 7.2.9. – 7.2.10. (разведение кДНК буфером для растворения) и п. 7.3. («Проведение полимеразной цепной реакции»).

7.1. Выделение РНК из плазмы крови

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

ВНИМАНИЕ! На данном этапе используйте только наконечники с маркировкой «RNase-free, DNase-free».

7.1.1. Промаркируйте необходимое количество новых пластиковых пробирок объемом 1,5 мл с учётом пробирок для отрицательного контрольного образца «К–».

- 7.1.2. Внесите по 10 мкл внутреннего контрольного образца (РНК-ВК) в каждую пластиковую пробирку.
- 7.1.3. Внесите по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь краёв пробирки.
- 7.1.4. Добавьте в пробирки для исследуемых образцов 100 мкл исследуемого образца (плазмы крови). В пробирку, промаркированную «К-», добавьте 100 мкл отрицательного контрольного образца.
- 7.1.5. Плотно закройте крышки пробирок, перемешайте на вортексе в течение 3–5 сек и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 7.1.6. Термостатируйте исследуемые образцы и «К-» при 65°C в течение 15 мин, осадите конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.
- 7.1.7. Добавьте в каждую пробирку 400 мкл реагента для преципитации, встряхните на вортексе в течение 3–5 сек.
- 7.1.8. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре (18–25°C).
- 7.1.9. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 7.1.10. Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 7.1.11. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре (18–25°C).
- 7.1.12. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 7.1.13. Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 7.1.14. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре (18–25°C).
- 7.1.15. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 7.1.16. Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 65°C в течение 5 мин.

- 7.1.17. Добавьте к осадку 16,5 мкл буфера для растворения и прогрейте пробирки при 65°C в течение 10 мин, встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.
- 7.1.18. Осадите конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.

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. Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-типирование HCV+дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при 18–25°C, затем тщательно перемешайте на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.2.2. В отдельной пластиковой пробирке приготовьте ОТ-смесь путём смешивания буферного раствора «ОТ-буфер», праймеров «Праймеры ОТ-типирование HCV+дНТФ» и обратной транскриптазы:

- 2,0 x (N+1) мкл буферного раствора «ОТ-буфер»,
 - 1,0 x (N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ-типирование HCV+дНТФ»,
 - 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,
- где N+1 – количество анализируемых на наличие РНК HCV образцов с учётом «К–» (N) с запасом на 1 образец.

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

7.2.3. Перемешайте приготовленную ОТ-смесь на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.2.4. По 3,5 мкл ОТ-смеси внесите в пробирки с выделенным образцом РНК и в пробирку «К–».

7.2.5. Пробирки встряхните на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.2.6. Пробирки поместите в термостат и инкубируйте при температуре 40°C в течение 30 мин, затем прогрейте при температуре 95°C в течение 5 мин.

- 7.2.7. Осадите капли центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек при комнатной температуре.
- 7.2.8. К полученной кДНК добавьте 10 мкл буфера для растворения из комплекта для выделения нуклеиновых кислот.
- 7.2.9. Пробирки встряхните на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

Препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

Примечание. Допускается хранение кДНК при температуре минус 20°C 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.

«HCV-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 набором реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С и ОТ-ГЕПАТОГЕН-С КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ, комплект «HCV-общий» не используется.

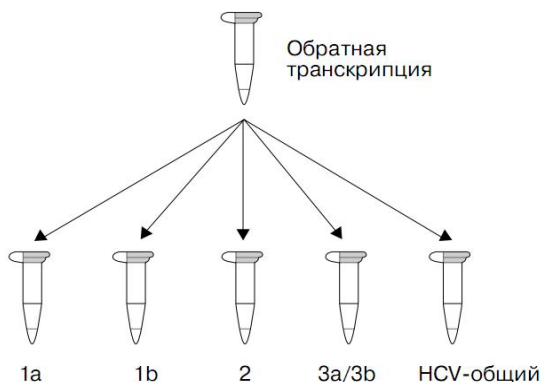


Рисунок 1. Исследование на выявление HCV и его генотипирование

7.3. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

- 7.3.1. Разморозьте при комнатной температуре (18–25°C) ПЦР-буфер из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации, затем тщательно перемешайте на вортексе и осадите капли

центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.3.2. Промаркируйте 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+», отрицательного контрольного образца «K-».

Пример. 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 ДНК, полученной при работе с наборами реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С и ОТ-ГЕПАТОГЕН-С КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ, комплект «HCV-общий» не используется в исследовании.

7.3.3. Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:

- 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,
 - 0,5 x (N+1) мкл Taq-полимеразы,
- где N+1 - количество промаркированных пробирок с учётом «K-» и «K+» (N) с запасом на 1 образец.

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

- 7.3.4. Смесь перемешайте на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.
- Смесь можно хранить при комнатной температуре не более 1 часа.
- 7.3.5. Во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, добавьте по 10 мкл тщательно перемешанной смеси ПЦР–буфера с Taq-полимеразой.
- 7.3.6. Добавьте в каждую пробирку по 1 капле минерального масла (20 мкл), закройте пробирки.

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

- 7.3.7. Внесите в амплификационные пробирки (кроме пробирок «К–» и «К+»), не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл соответствующего препарата кДНК.
- 7.3.8. В пробирки, маркированные «К–», не повреждая слой парафина, внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК и реакцию обратной транскрипции; в пробирки, маркированные «К+», внесите 5,0 мкл соответствующего положительного контрольного образца ДНК.
- 7.3.9. Центрифугируйте пробирки при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 7.3.10. Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР в режиме, приведённом в таблицах 2 и 3, с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл.

Таблица 2

Режим амплификации для детектирующих амплификаторов
ДТ-322 и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№ блока	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	2	00	1		Цикл
	94,0	1	00			
2	94,0	0	10	50		Цикл
	62,0	0	20		√	
3	10,0	Хранение		Хранение

Таблица 3

Режим амплификации для детектирующего амплификатора
iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo.					
1	1				
		1	00:30	80,0	
		2	01:00	94,0	
2	5				
		1	00:20	94,0	
		2	00:30	62,0	
3	2				
		1	00:20	80,0	Real Time
Программа амплификации					
4	45				
		1	00:10	94,0	
		2	00:20	62,0	Real Time
5		10,0	storage

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

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, 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 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Детекция, учёт и интерпретация результатов осуществляется на приборах ДТ-322, 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 определённого 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 крови, не содержащих РНК вируса 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 положительных результатов по двум генотипам для одного образца (например, генотипы 1a и 1b) 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 (рисунок 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 могут свидетельствовать о наличии других вариантов HCV в исследуемом образце (например, генотипы 4, 5 и 6).

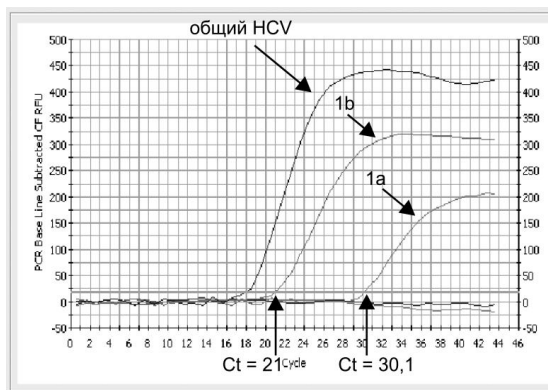


Рисунок 2. Экспоненциальный рост уровня флуоресценции по нескольким генотипам: выявлен генотип 1b.

Таблица 4

Сводная таблица по учёту и интерпретации результатов проведённого исследования

Экспоненциальный рост уровня флуоресценции (положительный результат)			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 реагентов - 9 месяцев с даты изготовления.
- 10.2.** Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить при температуре минус 20°C в течение всего срока годности. Допускается хранение ПЦР-буфера, минерального масла и положительного контрольного образца при температуре 2–8°C в течение всего срока годности набора. Допускается многократное размораживание ПЦР-буфера и минерального масла.
- 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°C в течение всего срока годности набора.
- 10.4.** Смесью ПЦР-буфера с Taq-полимеразой следует хранить при температуре 18–25°C не более 1 ч.
- 10.5.** Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.
- 10.6.** Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 10.7.** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6

Тел./факс + 7 (495) 980-45-55

E-mail: help@dna-technology.ru

www.dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

<http://www.dna-technology.ru/support/>

Номер 140-3
22.08.11

ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс (495) 980-45-55
E-mail: help@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru