

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов
для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 3)
вируса гепатита С (*HCV*) в клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] *HCV-1/2/3-FL*»

Вариант FEP

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ «NucliSENS® easyMAG™»	4
ПРОГРАММА АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ПРИБОРОВ РАЗЛИЧНЫХ ИЗГОТОВИТЕЛЕЙ ..	7
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.10. .	8
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА АЛА-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 5.1.0 И ВЫШЕ	11
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА «ДЖИН-4» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.4I.	14

НАЗНАЧЕНИЕ.

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 3) вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HCV-1/2/3-FL» **вариант FEP** совместно с трехканальными и четырехканальными детекторами конечной флуоресценции Ala-1/4 при использовании программного обеспечения версии 4.x и 5.x, а также четырехканальным детектором Джин при использовании программного обеспечения версии 4.4i.

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов ¹
Канал для флуорофора FAM	FAM/Специфика
Канал для флуорофора JOE	HEX/БК
Канал для флуорофора ROX	ROX

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной ДНК/РНК следующих организмов и вирусов: вирус гепатита А; вирус гепатита В; вирус гепатита D; вирус иммунодефицита человека; цитомегаловирус; вирус Эпштейна-Барр; вирус простого герпеса типы 1, 2; вирус ветряной оспы; вирус герпеса человека типы 6, 8; парвовирус В19; вирус клещевого энцефалита; вирус лихорадки западного Нила; аденовирус типы 2, 3, 7; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pyogenes*; *Streptococcus agalactiac*; *Homo sapiens*.

¹ Название каналов детекции для соответствующего детектора см. в соответствующем разделе методических рекомендаций к набору реагентов.

ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ «NucliSENS® easyMAG™»

ВНИМАНИЕ! При использовании автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) **не требуется** использование комплекта реагентов «ЕМ-плюс». Заявленные аналитические характеристики набора реагентов в случае экстракции РНК при помощи автоматической станции с использованием реагентов NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) без комплекта реагентов «ЕМ-плюс» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) сохраняются.

Порядок работы.

Вариант 1. Выделение РНК из образца объемом 100 мкл и лизис образца вне прибора.

1. Включить прибор «NucliSENS® easyMAG™» и подготовить его к выделению РНК/ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для выделения РНК-плазма (*Plasma*), объем образца (*volume*) – 0,1 ml, объем элюции (*Euate*) – 55 mkl, тип образца (*Type*) – Lysed, очередность выделения РНК в образцах (*priority*) – normal.
3. Создать новый протокол выделения РНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: *On-board Lysis Buffer Dispensing-**No**, On-board Lysis Incubation-**No***.
4. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
5. В пробирки, предназначенные для выделения РНК/ДНК в приборе «NucliSENS® easyMAG™», раскатать по **450 мкл буфера для лизиса NucliSens**.
6. В каждую пробирку добавить **100 мкл исследуемой плазмы** отдельным наконечником с аэрозольным барьером, тщательно перемешать пипетированием.
7. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контрольный образец (ПКО)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-НСV**, тщательно перемешать пипетированием.
8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контрольный образец (ОКО)**. Для этого в пробирку с буфером для лизиса NucliSens добавить **100 мкл ОКО**, тщательно перемешать пипетированием.

9. Оставить пробирки на 10 мин при комнатной температуре для прохождения лизиса.
10. Добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **10 мкл магнитной силики NucliSens**. Каждую пробирку тщательно перемешать пипетированием с помощью дозатора отдельными наконечниками с аэрозольным барьером на 1000 мкл.
11. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения РНК с лизисом образцов вне прибора (*off board*).
12. После окончания выделения РНК, извлечь пробирки из прибора и **не позднее 30 мин после окончания процедуры выделения РНК провести реакцию ОТ-ПЦР**.

Вариант 2. Выделение РНК из образца объемом от 100 мкл до 1 мл с автоматическим лизисом образца в приборе.

1. Поставить флакон с буфером для лизиса NucliSens в прибор.
2. Для повышения чувствительности метода объем исследуемой плазмы может варьировать от 100 мкл до 1 мл. При этом лизис образца происходит в автоматическом режиме в приборе «NucliSENS® easyMAG™», а объем буфера для лизиса NucliSens увеличивается до 2 мл. Для этого в каждую пробирку, предназначенную для выделения РНК/ДНК в приборе «NucliSENS® easyMAG™», необходимо добавить от 100 мкл до 1 мл исследуемой плазмы отдельным наконечником с аэрозольным барьером.
3. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контрольный образец (ПКО)**. Для этого в пробирку с буфером для лизиса NucliSens добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-1-HCV**, тщательно перемешать пипетированием.
4. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контрольный образец (ОКО)**. Для этого в пробирку с буфером для лизиса NucliSens добавить **100 мкл ОКО**, тщательно перемешать пипетированием.
5. Включить прибор «NucliSENS® easyMAG™» и подготовить его к выделению РНК/ДНК, следуя инструкции к прибору.
6. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (Matrix) для выделения РНК-плазма (Plasma), объем образца (volume) – от 100 mkl до 1 ml, в зависимости от объема используемого клинического материала, объем элюции (Euate) – 55 mkl, тип образца (Type) – Primary, очередность выделения РНК в образцах (priority) – normal.

7. Создать новый протокол выделения РНК/ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в приборе: *On-board Lysis Buffer Dispensing -Yes, On-board Lysis Incubation - Yes.*
8. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
9. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения РНК с лизисом образцов в приборе (*on board*).
10. Дождаться, пока автоматическая станция «NucliSENS® easyMAG™» не остановит работу в положении «Instrument State-Idle» (приблизительно 15 минут).
11. Открыть крышку прибора и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **10 мкл магнитной силики NucliSens**. Каждую пробирку тщательно перемешать пипетированием с помощью дозатора отдельными наконечниками с аэрозольным барьером на 1000 мкл.
12. Запустить на приборе программу продолжения выделения РНК.
13. После окончания выделения РНК, извлечь пробирки из прибора и не позднее 30 мин после окончания процедуры выделения РНК провести реакцию ОТ-ПЦР.

Набор реагентов при использовании автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™» позволяет работать с объемами образцов от 0,1 мл до 1 мл.

ПРОГРАММА АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ПРИБОРОВ РАЗЛИЧНЫХ ИЗГОТОВИТЕЛЕЙ

Таблица 1а. Программы амплификации для приборов «Терцик» («ДНК-Технология»), «Gradient Palm Cyclер» («Corbett Research»), «MaxyGene» («AXYGEN Scientific»), «GeneAmp PCR System 2400» («Perkin Elmer»):

Цикл	Температура, °C	Время	Циклов
1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1
3	95	2 с	45
	60	10 с	
4	10	Хранение	

Таблица 1б. Программы амплификации для приборов «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems») «PTC-100» («MJ Research»), «T-personal» («Biometra»):

Цикл	Температура, °C	Время	Циклов
1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1
3	95	10 с	45
	60	15 с	
	72	15 с	
4	10	Хранение	

ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.10.


Настройка теста.

Для детекции и интерпретации результатов используются следующие настройки теста:

- Наименование теста – «HCV-123»,
- Внутренний контроль отсутствует, специфика по каналам **FAM, HEX, ROX**,
- Привязка каналов: **FAM** - Генотип 1, **HEX** - Генотип 2 и **ROX** - Генотип 3,
- Пороговые значения для каналов **FAM, HEX** и **ROX** должны составлять «п-» = **2,0** и «п+» = **2,4**.

Настройки теста можно просмотреть и изменить, выбрав опцию «Список тестов» в главном меню «Настройки». После ввода указанных значений, следует нажать кнопку «Сохранить».

Проведение детекции.

1. Включить прибор и запустить на компьютере, присоединенном к прибору, программное обеспечение «ALA-1» (версия 4.1).
2. Выбрать в меню «Протокол» опцию «Создать новый». Выбрать тип ротора (36 x 0,5 или 48 x 0,2). Выбрать в меню тест «HCV-123». Ввести последовательность исследуемых образцов и контрольных фоновых образцов в колонке «Образец» (для обозначения фоновых пробирок в графе «Образец» используется сочетание клавиш «Ctrl» + «F»). Закрыть окно редактирования протокола детекции.
3. Поставить пробирки в ячейки предварительно снятого ротора прибора «АЛА-1/4» согласно заданной последовательности, установить ротор в модуль прибора, закрепить его фиксатором и закрыть крышку. Запустить измерение, нажав на значок детекции  (вверху экрана) или выбрав в меню «Протокол» опцию «Детекция». По окончании детекции на экран будет выведена таблица результатов.

Примечание – Если в одном протоколе проводится детекция более 36 образцов, то после окончания детекции партии из 36 (48) образцов необходимо извлечь ротор, поместить в него следующую группу образцов, поставить ротор в прибор и для продолжения детекции нажать кнопку «Продолжить» в окне программы.

Интерпретация результатов.

1. Полученные данные интерпретируются автоматически с помощью программы «ALA_1». Результаты в таблице представляются с помощью следующих

обозначений:

Первый столбец (канал 1, FAM): для образцов, в которых обнаружена РНК *HCV* 1 генотипа, указывается «*HCV* 1 – обнаружено» (на лиловом фоне); для образцов, в которых РНК *HCV* 1 генотипа не обнаружена, указывается «*HCV* 1 – не обнаружено» (на голубом фоне).

Второй столбец (канал 2, HEX): для образцов, в которых обнаружена РНК *HCV* 2 генотипа, указывается «*HCV* 2 – обнаружено» (на лиловом фоне); для образцов, в которых РНК *HCV* 2 генотипа не обнаружена, указывается «*HCV* 2 – не обнаружено» (на голубом фоне).

Третий столбец (канал 3, ROX): для образцов, в которых обнаружена РНК *HCV* 3 генотипа, указывается «*HCV* 3 – обнаружено» (на лиловом фоне); для образцов, в которых РНК *HCV* 3 генотипа не обнаружена, указывается «*HCV* 3 – не обнаружено» (на голубом фоне).

2. При получении результата детекции, который нельзя однозначно интерпретировать (возможно, положительный), в соответствующем столбце указывается «сомнительно». Для таких образцов требуется повторное проведение анализа.
3. Результат считается достоверным только в случае прохождения положительного и отрицательного контролей (см. табл. 2).

Таблица 2.

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Результат автоматической интерпретации
«ОКО»	Выделение РНК, ПЦР	« <i>HCV</i> 1 – не обнаружено» (FAM) « <i>HCV</i> 2 – не обнаружено» (HEX) « <i>HCV</i> 3 – не обнаружено» (ROX)
«ПКО»	Выделение РНК	« <i>HCV</i> 1 – обнаружено» (FAM) « <i>HCV</i> 2 – не обнаружено» (HEX) « <i>HCV</i> 3 – не обнаружено» (ROX)
«К+»	ПЦР	« <i>HCV</i> 1 – обнаружено» (FAM) « <i>HCV</i> 2 – обнаружено» (HEX) « <i>HCV</i> 3 – обнаружено» (ROX)

Результаты не подлежат интерпретации в случае:

- Отсутствия положительного сигнала в пробе с положительными контролями (ПКО и К+) – может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации или о других ошибках, допущенных на этапах выделения РНК и постановки ПЦР. Необходимо провести анализ повторно, начиная с этапа ОТ-ПЦР.
- Наличия в отрицательном контроле (ОКО) положительного сигнала – **указывает**

на наличие контаминации реактивов или проб на этапе выделения РНК или на этапе ПЦР. Необходимо принять меры по обнаружению и ликвидации источника контаминации, повторить анализ всех проб, начиная с этапа выделения РНК

Пример полученных результатов на приборе АЛА-1/4, версия ПО 4.1.

Образец	Тест	1	2	3	
1	F5	HCV-123	HCV 1 - обнаружено	HCV 2 - не обнаружено	HCV 3 - не обнаружено
2	D102	HCV-123	HCV 1 - обнаружено	HCV 2 - не обнаружено	HCV 3 - не обнаружено
3	D128	HCV-123	HCV 1 - обнаружено	HCV 2 - не обнаружено	HCV 3 - не обнаружено
4	D133	HCV-123	HCV 1 - не обнаружено	HCV 2 - обнаружено	HCV 3 - обнаружено
5	E10	HCV-123	HCV 1 - не обнаружено	HCV 2 - не обнаружено	HCV 3 - обнаружено
6	E13	HCV-123	HCV 1 - не обнаружено	HCV 2 - не обнаружено	HCV 3 - обнаружено
7	E48	HCV-123	HCV 1 - не обнаружено	HCV 2 - не обнаружено	HCV 3 - обнаружено
8	C127	HCV-123	HCV 1 - не обнаружено	HCV 2 - обнаружено	HCV 3 - не обнаружено
9	H8	HCV-123	HCV 1 - обнаружено	HCV 2 - не обнаружено	HCV 3 - не обнаружено
10	H39	HCV-123	HCV 1 - не обнаружено	HCV 2 - не обнаружено	HCV 3 - обнаружено
11	H82	HCV-123	HCV 1 - обнаружено	HCV 2 - не обнаружено	HCV 3 - не обнаружено
12	OK	HCV-123	HCV 1 - не обнаружено	HCV 2 - не обнаружено	HCV 3 - не обнаружено
13	K+	HCV-123	HCV 1 - обнаружено	HCV 2 - обнаружено	HCV 3 - обнаружено
14	фон	HCV-123	120.69	252.22	115.10
15					
16					

Образцы №1-3, 9 и 11 содержат РНК HCV 1 генотипа, образец №8 содержит РНК HCV 2 генотипа, образцы №4-7 и 10 содержат РНК HCV 3 генотипа.



ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА АЛА-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 5.1.0 И ВЫШЕ

1. Включить прибор и запустить программу «ALA_1» на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Тест для генотипирования HCV может быть предустановлен в программе «АЛА-1» если используется версия программы v.5.1.0 и выше.
3. Проверить наличие теста «HCV-123» в списке настроенных тестов программы «АЛА-1». Для этого выбрать в основном меню программы «Настройки» → «Настройка тестов». В появившемся окне «Окно настройки тестов» в таблице «список тестов» найти тест «HCV-123».
4. Если тест «HCV-123» не был предустановлен в программе «АЛА-1», то для проведения детекции и интерпретации результатов необходимо создать новый тест: «HCV-123» или импортировать его через архивный файл в список тестов, используемых на программе «ALA_1».



ВНИМАНИЕ! Импорт или создание новых тестов в программе «ALA_1» возможно только для пользователей с правами администратора.

Вариант 1. Импортировать новый тест. Импорт новых тестов в программе «ALA_1» осуществляется через выбор основного меню «Настройки» → «Импорт тестов». Далее выбрать архивный файл в формате *.zip и импортировать его в программу.


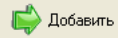

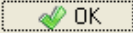
Вариант 2. Создать новый тест.

- Выбрать в основном меню программы «Настройки» → «Настройка тестов». В появившемся окне «Окно настройки тестов» добавить название нового теста «HCV 123» кнопкой  «Добавить» в таблице «Список тестов».
- В поле «Каналы для данной реакционной смеси и их обозначения» задать каналы детекции: FAM, HEX и ROX. Для этого в таблице «Список каналов» выбрать канал FAM и нажать стрелку  «Добавить». Выбранный канал появится в таблице «Каналы и обозначения», под таблицей в поле «Обозначения» задать обозначения по этому каналу «HCV1», в поле пороги для «+» и «-» задать «2.5» и «2.0» соответственно. Повторить тоже самое для каналов HEX («HCV2») и ROX («HCV3»). Далее в поле «Введите/измените тип теста» выбрать тип теста «Общий».
- Отметить контроли, использующиеся в этом тесте: «ОКО» (отрицательный контроль выделения и амплификации), «ПКО» (положительный контроль

выделения и амплификации). Выбрать алгоритмы интерпретации для контролей по умолчанию.

- В поле «Таблица интерпретации результатов» нажать кнопку  «Создать». Программой «ALA_1» будет автоматически создана таблица возможных вариантов сочетаний результатов детекции для всех каналов и итоговый результат для каждого из этих вариантов. Продолжением этой таблицы являются возможные варианты сочетаний результатов контролей. Результаты детекции клинических образцов и контролей будут выдаваться после измерения в соответствии с этой таблицей. Сохранение теста и закрытие окна осуществляется кнопкой  «ОК».

5. Создать протокол измерения.

- В основном окне программы нажать кнопку  «Новый протокол». В появившемся окне «Окно настройки протокола» выбрать тест «HCV-123» из списка доступных тестов и нажать стрелку  «Добавить». Выбранный тест появится в списке «Тесты протокола».
- В поле «Количество образцов» задать количество исследуемых образцов без фоновых пробирок и контрольных образцов, нажать кнопку  «Добавить». В поле «Количество фоновых пробирок» выбрать необходимое количество фона.
- В «Таблице имён образцов, фоновых пробирок и контролей» задать имена образцов, добавить необходимое количество контролей. В поле «Тип ротора» выбрать ротор, который будет использоваться в данном протоколе. Сохранение протокола и закрытие окна осуществляется кнопкой  «ОК».

- #### 6. Поставить пробирки в ячейки модуля прибора «АЛА-1/4» в соответствии с заданной последовательностью. Запустить измерение, нажав на кнопку «Измерить» в панели активных кнопок (вверху экрана).

Интерпретация результатов.

1. Результат измерения выдаётся программой после завершения измерения протокола в окне «Окно результатов». Полученные данные интерпретируются программой автоматически в соответствии с «Таблицей интерпретации результатов». Для образцов, в которых обнаружена РНК HCV 1 генотипа, указывается «ОБНАРУЖЕНО (HCV 1)». Для образцов, в которых обнаружена РНК HCV 2 генотипа, указывается «ОБНАРУЖЕНО (HCV 2)». Для образцов, в которых обнаружена РНК HCV 3 генотипа, указывается «ОБНАРУЖЕНО (HCV 3)». При

получении результата детекции, который нельзя однозначно интерпретировать (возможно, положительный), указывается «Сомнительный». Для таких образцов требуется повторное проведение анализа.

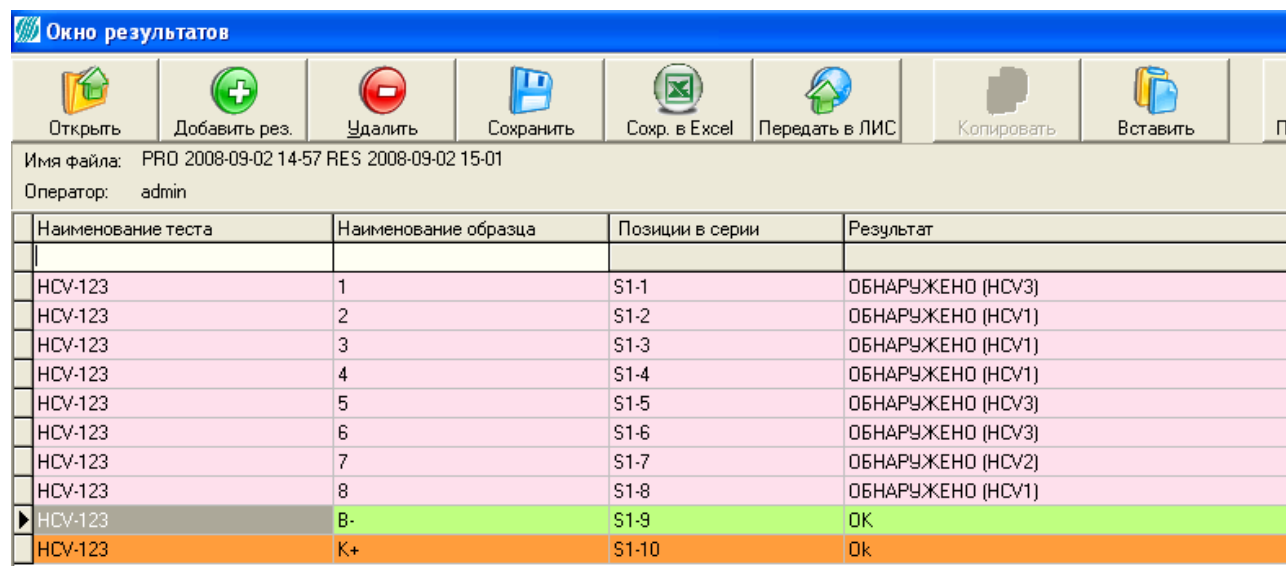
2. Результат считается достоверным только в случае прохождения положительного и отрицательного контролей (см. табл. 3).

Таблица 3.

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Результат, отображаемый прибором			Результат, выдаваемый прибором
		FAM	HEX	ROX	
«ОКО»	Выделение ДНК, ПЦР	«-»	«-»	«-»	ОК
«ПКО»	Выделение ДНК	«+»	«-»	«-»	ОК
«К+»	ПЦР	«+»	«+»	«+»	ОК

Пример полученных результатов на приборе АЛА-1/4, версия ПО 5.1.0



Наименование теста	Наименование образца	Позиции в серии	Результат
HCV-123	1	S1-1	ОБНАРУЖЕНО (HCV3)
HCV-123	2	S1-2	ОБНАРУЖЕНО (HCV1)
HCV-123	3	S1-3	ОБНАРУЖЕНО (HCV1)
HCV-123	4	S1-4	ОБНАРУЖЕНО (HCV1)
HCV-123	5	S1-5	ОБНАРУЖЕНО (HCV3)
HCV-123	6	S1-6	ОБНАРУЖЕНО (HCV3)
HCV-123	7	S1-7	ОБНАРУЖЕНО (HCV2)
HCV-123	8	S1-8	ОБНАРУЖЕНО (HCV1)
HCV-123	В-	S1-9	ОК
HCV-123	К+	S1-10	Ок

Образцы №2-4 и 8 содержат РНК HCV 1 генотипа, образец №7 содержит РНК HCV 2 генотипа, образцы №1, 5 и 6 содержат РНК HCV 3 генотипа.

ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА «ДЖИН-4» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.41.

Работа с прибором «Джин-4» проводится согласно описанию в паспорте «ПЦР-детектора флуоресцентного «Джин-4».


Настройка теста.

Для детекции и интерпретации результатов используются следующие настройки теста:

- Наименование теста – «*HCV-123*»
- Внутренний контроль отсутствует, специфика по каналам **Fam**, **Hex**, **Rox**
- Привязка каналов: **Fam** - Генотип 1, **Hex** - Генотип 2 и **Rox** - Генотип 3
- Пороговые значения для каналов **Fam**, **Hex** и **Rox** должны составлять «п-» = **2,0** и «п+» = **3,0**.

Настройки теста можно просмотреть, выбрав в меню «Настройки» опцию «Список тестов». Если значения изменены, требуется восстановить начальные значения, указанные выше, и сохранить изменения при выходе из программы.

Проведение детекции.

1. Включить прибор и запустить программное обеспечение «Gene».
2. Задать протокол измерения. Ввести количество измеряемых образцов (включая фоновые пробирки), выбрать тест «**HCV-123**» в списке опции «Тест», нажать «ОК», и ввести названия детектируемых образцов (в колонке «Образец»).
3. В качестве образца, обозначенного «ФОН» использовать контрольный образец «Фон».
4. Поставить пробирки в ячейки модуля прибора «Джин-4» согласно заданной последовательности (по 12 образцов на каждый цикл детекции), закрыть крышку прибора. Запустить измерение, нажав на значок  (вверху экрана). По окончании измерения вынуть пробирки и нажать «ОК».

Интерпретация результатов.

1. Положительные образцы обозначаются знаком «+» (на красном фоне), отрицательные образцы – знаком «-» (на зеленом фоне). В пробах, содержащих РНК *HCV* 1 генотипа, детектируется положительный сигнал по каналу **Fam** (указывается «+» в столбце «**FAM**»). В пробах, содержащих РНК *HCV* 2 генотипа, детектируется положительный сигнал по каналу **Hex** (указывается «+» в столбце «**Hex**»). В пробах, содержащих РНК *HCV* 3 генотипа, детектируется положительный

сигнал по каналу Rox (указывается «+» в столбце «Rox»). При получении результата детекции, который нельзя однозначно интерпретировать (возможно, положительный), указывается «?». Для таких образцов требуется повторное проведение анализа.

2. Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей (см. табл. 4).

Таблица 4.

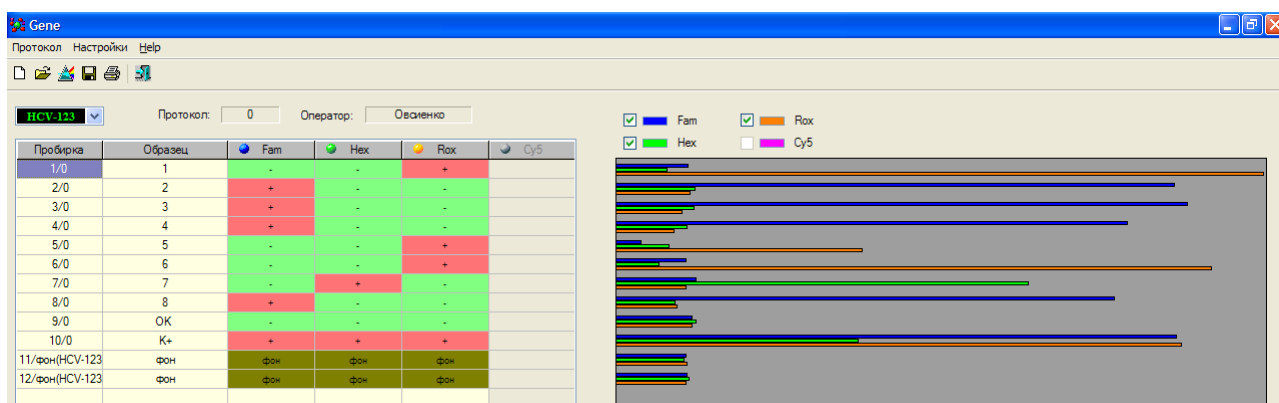
Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Результат, отображаемый прибором		
		Fam	Hex	Rox
«ОКО»	Выделение ДНК, ПЦР	«-»	«-»	«-»
«ПКО»	Выделение ДНК	«+»	«-»	«-»
«K+»	ПЦР	«+»	«+»	«+»

Результаты не подлежат интерпретации в случае:

- Отсутствия положительного сигнала в пробе с положительными контролями (ПКО и K+) – может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации или о других ошибках, допущенных на этапах выделения РНК и постановки ПЦР. Необходимо провести анализ повторно, начиная с этапа ОТ-ПЦР.
- Наличие в отрицательном контроле (ОКО) положительного сигнала – **указывает на наличие контаминации** реактивов или проб на этапе выделения РНК или на этапе ПЦР. Необходимо принять меры по обнаружению и ликвидации источника контаминации, повторить анализ всех проб, начиная с этапа выделения РНК

Пример полученных результатов на приборе «Джин-4», версия 4.4i



Образцы №2-4 и 8 содержат РНК HCV 1 генотипа, образец №7 содержит РНК HCV 2 генотипа, образцы №1, 5 и 6 содержат РНК HCV 3 генотипа.