

**«УТВЕРЖДАЮ»**

**Генеральный директор**

**ООО «ИМБИАН ЛАБ»**



**Осипова В.В.**

**2022 г.**

## **ИНСТРУКЦИЯ**

**по применению медицинского изделия для диагностики in vitro**

**Набор реагентов для качественного выявления и дифференциации методом ОТ-ПЦР in vitro генотипов вируса гепатита С (1a, 1b, 2, 3) в пробах нуклеиновых кислот, выделенных из плазмы и сыворотки крови человека «НСV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ» по ТУ 21.20.23-126-41390295-2021**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для качественного выявления и дифференциации методом ОТ-ПЦР in vitro генотипов вируса гепатита С (1a, 1b, 2, 3) в пробах нуклеиновых кислот, выделенных из плазмы и сыворотки крови человека «НСV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ» по ТУ 21.20.23-126-41390295-2021 (далее по тексту набор, набор реагентов) Предназначен для качественного выявления и дифференциации генотипов 1a, 1b, 2, 3 вируса гепатита С (Hepatitis C Virus, HCV) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробах нуклеиновых кислот (НК), выделенных из клинических образцов (плазма и сыворотка крови с установленным содержанием РНК HCV).

Предназначен для диагностики in vitro при профессиональном применении с целью выявления и дифференциации генотипов 1a, 1b, 2, 3 вируса гепатита С (Hepatitis C Virus, HCV).

**Функциональное назначение** - Набор реагентов HCV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ предназначен для диагностики in vitro при профессиональном применении с целью выявления и дифференциации генотипов 1a, 1b, 2, 3 вируса гепатита С (Hepatitis C Virus, HCV). Набор может быть использован для обследования пациентов с установленным содержанием РНК HCV в крови из всех групп населения любого возраста без градации по демографическому или популяционному признаку.

Полученные результаты не являются основанием для постановки диагноза, а используются только в сочетании с другими лабораторными показателями и диагностической информацией.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА – клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению. Набора реагентов **НСV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ** может быть использован в клинической лабораторной диагностике для генотипирования вируса гепатита С.

3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА – сотрудники клиничко-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ДНК-диагностики.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор **НСV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ** выпускается в одном варианте исполнения, предназначенном для качественного выявления и дифференциации генотипов вируса гепатита С (табл. 1).

Набора рассчитан на проведения ОТ-ПЦР – анализа 100 образцов, включая контрольные, и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента кДНК, полученной путем проведения обратной транскрипции, методом гибридизации с зондами «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах.

Таблица 1

| № | Набор              | Состав                                                                                                                                                                                                           | Фасовка                                                                                                                |
|---|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | НСV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ | 1. Реакционная смесь 1100 мкл<br>2. Разбавитель 1,8 мл<br>3. Смесь ферментов 550 мкл<br>4. Положительный контрольный образец 400 мкл<br>5. Вкладыш с данными стандартных образцов<br>6. Инструкции по применению | 1 пробирка – 1100 мкл<br>1 пробирка – 1,8 мл<br>1 пробирка – 550 мкл<br>1 пробирка – 400 мкл<br><br>1 шт.<br><br>1 шт. |

В состав набора выходят готовые к применению реагенты.

В состав реакционной смеси входят:

- раствор дНТФ;
- ОТ-ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды: зонд для специфического фрагмента генома вируса гепатита С генотипа 1a содержит флуорофор Cy5, зонд для специфического фрагмента генома вируса гепатита С генотипа 1b содержит флуорофор FAM, зонд для специфического фрагмента генома вируса гепатита С генотипа 2 содержит флуорофор ROX, зонд для специфического фрагмента генома вируса гепатита С генотипа 3 содержит флуорофор HEX, зонд для внутреннего контроля - консервативного фрагмента генома вируса гепатита С – содержит флуорофор Cy5.5.

•праймеры для выявления кДНК генотипов 1a, 1b, 2,3 HCV;

•праймеры для выявления внутреннего контроля – кДНК консервативного участка генома вируса гепатита С; внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации (ОТ-ПЦР), а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения РНК.

В состав Смеси ферментов входят:

- Taq-полимераза;
- обратная транскриптаза;
- ингибитор рибонуклеаз;
- дитиотрейтол;
- буфер.

Для проведения исследования необходимо приготовить амплификационную смесь из Реакционной смеси, Разбавителя и Смеси ферментов, входящих в состав набора.

ПКО (положительный контрольный образец) представляет собой смесь кДНК-мишеней генома вируса гепатита С и его генотипов 1a, 1b, 2,3.

Для проведения исследования необходимо приготовить амплификационную смесь из Реакционной смеси, Разбавителя и Смеси ферментов, входящих в состав набора.

ПКО (положительный контрольный образец) представляет собой смесь кДНК-мишеней генома вируса гепатита С и его генотипов 1a, 1b, 2,3.

#### 4.2. Комплектность

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- памятка по применению набора.
- вкладыш с данными положительного контрольного образца
- паспорт (при необходимости, ГОСТ Р 51088 предоставляется по запросу пользователя)

#### 4.3. Принцип метода

Набора реагентов HCV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ основан на использовании метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для определения специфических участков РНК вируса гепатита С генотипов 1a, 1b, 2, 3 путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

В основе метода лежит выявление специфического фрагмента РНК вируса путем получения ДНК-копии (кДНК) с РНК-матрицы с помощью реакции обратной транскрипции и накопления (амплификации) копий данного фрагмента ДНК-мишени с помощью полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени».

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Гибридизационно-флуоресцентная детекция позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени»). Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе. Олигонуклеотидный зонд, несущий флуоресцентную метку, специфически гибридизуется с ампликоном. В ходе последующей элонгации происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным ее регистрацию на флуоресцентном детекторе.

При проведении регистрации продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени») изменения проводятся в каждом цикле амплификации. С использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Cycle threshold, Ct).

**4.4. Метрологическая прослеживаемость значений концентрации контрольных образцов набора реагентов проведения до уровня контрольных образцов предприятия (калибраторов второго порядка), изготовленных из кДНК геномной РНК HCV генотипов 1a, 1b, 2, 3.** Концентрацию контрольных образцов предприятия определяют стандартизированной методикой количественной ОТ-ПЦР с использованием международного количественно охарактеризованного стандарта (6<sup>th</sup> WHO International Standard for HCV RNA for NAT, 18/184 NIBSC). Коммутабельность контрольных образцов предприятия подтверждена результатами измерения концентрации и генотипирования РН референтной и рутинной методиками, предназначенными для измерения показателей концентрации или видоспецифичного анализа генетической последовательности, соответственно, при исследовании НК, выделенной из соответствующих клинических образцов (ГОСТ ISO 17511-2011).

#### **4.5. Ограничения метода**

При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с РНК и кДНК, могут наблюдаться ложноотрицательные реакции.

### **5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА**

#### **5.1. Аналитическая специфичность**

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам видоспецифичных генов возбудителей, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

Аналитическая специфичность набора реагентов, т.е. способность выявлять только РНК HCV, вне зависимости от присутствия в анализируемом образце НК других возбудителей, доказана производителем при исследовании РНК или ДНК следующих микроорганизмов: HAV, HBY, HDV, HIV, HSV 1 и 2 типа, CMV, EBV, VZV, HHV6 TBE Virus Adenovirus 2 3 и 7 типов Parvovirus B19, вируса гриппа типов А и В, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumonia, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Candida albicans, Neisseria meningitidis, Mycobacterium tuberculosis, Leprosira spp., Haemophilus influenza, Treponema pallidum, а также геномной ДНК человека в диапазоне концентраций  $10^5$ - $10^7$  МЕ/мл. Отсутствие перекрестных реакций между генотипами

НСV доказана производителем при исследовании высококонцентрированных образцов РНК НCV генотипов 1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6.

Ложноположительные и ложноотрицательные результаты выявлены не были. Специфичность, рассчитанная как % истинно отрицательных результатов для отрицательных проб на целевой маркер, составила 100%.

Максимальная концентрация, при которой вышеперечисленные микроорганизмы и вирусы не влияли на эффективность изделия, равно верхнему диапазону концентраций.

На этапе технических испытаний были предоставлены образцы НК других возбудителей в концентрациях:

| Наименование                       | Концентрация (МЕ/мл) |
|------------------------------------|----------------------|
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>  | $2,1 \cdot 10^6$     |
| <i>Streptococcus salivarius</i>    | $3,5 \cdot 10^6$     |
| <i>Enterococcus faecium</i> ,      | $8,3 \cdot 10^5$     |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>    | $9,2 \cdot 10^5$     |
| <i>Staphylococcus aureus</i> .     | $6,2 \cdot 10^5$     |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>      | $1,1 \cdot 10^6$     |
| ДНК человека                       | $9,1 \cdot 10^5$     |
| <i>Escherichia coli</i>            | $3,5 \cdot 10^6$     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>      | $7,2 \cdot 10^5$     |
| <i>Candida albicans</i>            | $5,9 \cdot 10^5$     |
| <i>Leptospira spp.</i>             | $7,9 \cdot 10^4$     |
| <i>Neisseria meningitidis</i>      | $4,2 \cdot 10^5$     |
| <i>Haemophilus influenza</i>       | $1,1 \cdot 10^6$     |
| ДНК человека                       | $8,6 \cdot 10^5$     |
| <i>Moraxella catarrhalis</i>       | $4,2 \cdot 10^5$     |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i>  | $2,7 \cdot 10^5$     |
| <i>Treponemapallidum</i>           | $1,4 \cdot 10^5$     |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | $2,3 \cdot 10^5$     |
| ДНК человека                       | $7,3 \cdot 10^5$     |
| HSV 1 muna                         | $4,7 \cdot 10^5$     |
| HSV 2 muna                         | $4,4 \cdot 10^5$     |
| CMV                                | $1,3 \cdot 10^5$     |
| ДНК человека                       | $8,1 \cdot 10^5$     |
| EBV                                | $6,4 \cdot 10^5$     |
| VZV                                | $1,7 \cdot 10^5$     |
| Adenovirus                         | $2,2 \cdot 10^5$     |
| Parvovirus                         | $4,6 \cdot 10^5$     |
| ДНК человека                       | $7,4 \cdot 10^5$     |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>       | $3,8 \cdot 10^6$     |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>     | $7,8 \cdot 10^5$     |
| ДНК человека                       | $8,3 \cdot 10^5$     |

## 5.2. Аналитическая чувствительность

С помощью набора **НСV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ** можно обнаружить 1000 и более МЕ/мл каждого генотип вируса гепатита С, присутствующего в прошедшей обработке (выделение РНК) пробе.

## 5.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения согласно исследованию «Аналитической чувствительности» составляет 10<sup>3</sup> МЕ/мл для каждого гепатита (с вероятностью ложного утверждения об отсутствии компонента (концентрация РНК искомого анализата (HCV)) равной 5 % (доверительная вероятность предела обнаружения равна 95%).

- 6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА**
- 6.1. Диагностическая чувствительность** выявления РНК вируса гепатита С генотипа 1a: 100% (интервал 92,0% - 100%, с доверительной вероятностью 95%).
- Диагностическая чувствительность** выявления РНК вируса гепатита С генотипа 1b: 100% (интервал 97,7% - 100%, с доверительной вероятностью 95%).
- Диагностическая чувствительность** выявления РНК вируса гепатита С генотипа 2: 100% (интервал 93,4% - 100%, с доверительной вероятностью 95%).
- Диагностическая чувствительность** выявления РНК вируса гепатита С генотипа 3: 100% (интервал 97,2% - 100%, с доверительной вероятностью 95%).

- 6.2. Диагностическая специфичность** выявления РНК вируса гепатита С генотипа 1a: 100% (интервал 98,9% - 100%, с доверительной вероятностью 95%).
- Диагностическая чувствительность** выявления РНК вируса гепатита С генотипа 1b: 100% (интервал 98,4% - 100%, с доверительной вероятностью 95%).
- Диагностическая чувствительность** выявления РНК вируса гепатита С генотипа 2: 100% (интервал 98,9% - 100%, с доверительной вероятностью 95%).
- Диагностическая чувствительность** выявления РНК вируса гепатита С генотипа 3: 100% (интервал 98,6% - 100%, с доверительной вероятностью 95%).

**6.3. Показана тождественность** диагностических характеристик набора **HCV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ** на разных видах клинических образцов (сыворотка и плазма крови).

Таблица 2.

| Клинический материал | Количество образцов от пациентов | Количество положительных образцов | Генотип HCV | Результаты испытаний             |                               |
|----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------|----------------------------------|-------------------------------|
|                      |                                  |                                   |             | Диагностическая чувствительность | Диагностическая специфичность |
| Плазма крови         | 363                              | 41                                | 1a          | 100% (95% ДИ: 93,0-100%)         | 100% (95% ДИ: 99,1-100%)      |
|                      |                                  | 152                               | 1b          | 100% (95% ДИ: 98,0-100%)         | 100% (95% ДИ: 98,6-100%)      |
|                      |                                  | 49                                | 2           | 100% (95% ДИ: 94,1-100%)         | 100% (95% ДИ: 99,1-100%)      |
|                      |                                  | 118                               | 3           | 100% (95% ДИ: 97,5-100%)         | 100% (95% ДИ: 98,8-100%)      |
| Сыворотка крови      | 319                              | 36                                | 1a          | 100% (95% ДИ: 92,0-100%)         | 100% (95% ДИ: 98,9-100%)      |
|                      |                                  | 131                               | 1b          | 100% (95% ДИ: 97,7-100%)         | 100% (95% ДИ: 98,4-100%)      |
|                      |                                  | 44                                | 2           | 100% (95% ДИ: 93,4-100%)         | 100% (95% ДИ: 98,9-100%)      |
|                      |                                  | 106                               | 3           | 100% (95% ДИ: 97,2-100%)         | 100% (95% ДИ: 98,6-100%)      |

**6.4. Воспроизводимость и повторяемость** результатов исследования с использованием набора **HCV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ** составляет 100% и подтверждена в ходе проведения клинических испытаний на разных сериях набора (внутрисерийная, межсерийная и

внутрипостановочная воспроизводимость). Коэффициент вариации измерения  $C_t$  по соответствующим каналам флуоресценции для одного и того же образца (как положительного, так и отрицательного) не превышает 2%.

6.5 В ходе проведения клинических испытаний было оценена эквивалентность определения аналита в сыворотке и плазме крови (с антикоагулянтами  $K_2$ ЭДТА и цитратом натрия 3,8%). Полученные результаты свидетельствуют о эквивалентности определения.

## **7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (ГОСТ 31508-2013).

### **7.1. Требования безопасности при работе с набором**

7.1.1 Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

7.1.2 При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней";

- убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней";

- удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

**ВНИМАНИЕ!** При удалении пробирок, содержащих продукты ПЦР, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами ПНУ групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики;

- не использовать набор по истечении срока годности.

7.1.3 При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных,

общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

## **7.2. Требования охраны окружающей среды**

7.2.1. Набор реагентов не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности. В том числе в случае отклонений в функционировании медицинского изделия, включая определяемые по внешним признакам.

7.2.2. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.

7.2.3. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав набора не выходят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

7.2.4. Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. Реагенты, входящие в состав набора, безопасны для окружающей среды, не содержат цианид и азид натрия, а также другие вредные вещества.

7.2.5. Набор реагентов не содержит: лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсибилизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

## **8. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ**

- Набора реагентов для проведения ОТ-ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- Термостат программируемый (амплификатор) или анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени, ДТпрайм (DTprime) в модификации 4M1 (ПУ № ФСР 2011/10229, производства ООО «НПО ДНК-Технология»), CFX-96 Touch (ПУ № ФСЗ 2008/03399);
- Пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5-10; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл;
- Одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 10, 100, 200 и 1000 мкл;
- Бесцветные одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 1,5 или 2,0 мл;
- Холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- Перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

## **9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА**

### **9.1. Материал для исследования.**

Материалом для исследования набором реагентов НСВ-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ являются образцы РНК, выделенные из клинических проб (сыворотка и плазма крови с установленным содержанием РНК НСВ). Для установления содержания РНК НСВ в образцах могут быть использованы любые зарегистрированные на территории РФ наборы реагентов для выявления

РНК вируса гепатита С в плазме и сыворотке крови (например набор реагентов для выделения НК «НК-сорбент», ООО НПФ «Литех», РУ № РЗН 2019/9331).

## 9.2. Взятие, доставка и хранение клинических образцов

Для получения плазмы крови 2-3 мл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку, содержащую порошок или раствор антикоагулянта (1,2 -2,0 мг К2 -ЭДТА или 3,8% (0,129 моль/л) раствор цитрата натрия. ГЕПАРИН ИСПОЛЬЗОВАТЬ НЕЛЬЗЯ!). При использовании системы вакуумного забора крови используются вакутейнеры с фиолетовой крышкой (с ЭДТА). Пробирка закрывается, перемешивается переворачиванием и маркируется. Для получения плазмы образцы крови центрифугируют в течение 10-15 минут при 10000-12000 g.

Для получения сыворотки крови 2-3 мл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пустую пробирку без антикоагулянта. При использовании системы вакуумного забора крови используются вакутейнеры с красной крышкой. Пробирка закрывается и маркируется. После образования сгустка крови образцы, для отделения сыворотки, подвергают центрифугированию в течение 10-15 минут при ускорении 10000 - 12000 g.

Транспортировка клинического материала должна производиться только в сумке-холодильнике. Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов. Заморозка клинического материала недопустима!

Допускается хранение биопроб при от +4 до +8°C не более 3 суток.

## 9.3. Предварительная обработка клинического материала

Обработка клинического материала для выделения РНК, а также его хранение производится согласно инструкции производителя набора для выделения РНК из клинического материала.

Для подготовки образцов РНК могут быть использованы любые зарегистрированные на территории РФ наборы реагентов для пробоподготовки с сорбентной очисткой, предназначенные для выделения нуклеиновых кислот (РНК) из клинического материала (сыворотка и плазма крови) для ПЦР-диагностики и позволяющие максимально удалить ингибиторы ПЦР из образца. Производитель рекомендует использовать зарегистрированный в установленном порядке набор «НК-сорбент» (ООО НПФ «Литех», РЗН 2019/9331) совместно с набором HCV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ для полного цикла исследования образцов.

Дополнительно для контроля качества процедуры выделения параллельно с клиническими образцами проводят пробоподготовку отрицательного контрольного образца этапа выделения, используя в качестве исследуемого образца физиологический раствор или деионизованную воду.

## 9.4. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой

Материалом для исследования набором реагентов HCV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ являются образцы РНК, выделенные из клинических проб. Анализ рисков показал, что возможными ошибками применения набора реагентов HCV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ могут являться:

- использование непредусмотренных для данного изделия видов анализируемого биологического материала или наборов для пробоподготовки (выделение РНК);
- интерферирующие вещества, входящие в состав клинического материала (например, избыточное количество примесей в виде гемоглобина, триглицеридов и прочих жиров в образцах плазмы и сыворотки крови), приводящие к получению недостаточно очищенного препарата РНК в результате неэффективной экстракции наборами для пробоподготовки.

Все это может приводить к ингибированию реакции амплификации, снижению чувствительности анализа и получению ложноотрицательных результатов. При использовании

зарегистрированного в установленном порядке набора реагентов для выделения НК «НК-сорбент» (РУ No PЗН 2019/9331) интерференции не ожидается производителем Набора реагентов НК-сорбент было показано сохранение эффективности выделения НК из сыворотки и плазмы крови в случае присутствия в клинических образцах потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, соответствующих верхней границе физиологической нормы, и превышающих их в несколько раз.

| Клинический образец      | Интерферент   | Допустимое содержание в образце |
|--------------------------|---------------|---------------------------------|
| сыворотка и плазма крови | гемоглабин    | 3 г/л                           |
|                          | билирубин     | 20,5 мкмоль/л                   |
|                          | холестерин    | 5 ммоль/л                       |
|                          | триглицериды  | 2,25 ммоль/л                    |
|                          | миоглобин     | 160 нг/мл                       |
|                          | K2-ЭДТА       | 1,8 мг/мл                       |
|                          | цитрат натрия | 0,129 моль/л                    |

Для контроля качества тестируемой РНК и присутствия возможных ингибиторов в наборе реагентов НСV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ предусмотрено тестирование внутреннего контрольного образца (ВКО) с помощью специальных праймеров, входящих в состав реакционной смеси (см. п. 4.1 Инструкции). По окончании реакции амплификации наличие сигнала по каналу Cy5,5 (сигнал выявления внутреннего контроля), свидетельствует о качестве тестируемого образца нуклеиновых кислот. Сигнал выявления внутреннего контроля не должен превышать конечный цикл, указанный в инструкции к ПЦР-набору. Отсутствие или снижение эффективности сигнала ВКО после проведения ОТ-ПЦР свидетельствует о ненадлежащем качестве образца для исследования и требует повторной пробоподготовки.

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

10.1. Подготовка к проведению амплификации.

10.1.1. Приготовить необходимое число бесцветных пробирок вместимостью 0,2 мл, включая пробирки для положительного контрольного образца и отрицательного контрольного образца этапа ПЦР (ОКО-ПЦР) и, при наличии, этапа выделения (ОКО-выделения).

*Маркировка пробирок на крышке возможна только для реал-тайм амплификатора Rotor Gene, для всех остальных амплификаторов маркировка пробирок на крышке недопустима! В таком случае пробирки следует расставить в соответствии с заранее подготовленной схемой.*

10.1.2. Полностью разморозить компоненты из набора. Пробирки с Реакционной смесью и Разбавителем тщательно перемешать.

10.1.3. Из компонентов набора приготовить амплификационную смесь из расчета на 1 образец (таблица 3):

Таблица 3.

| Компонент         | Количество (мкл) |
|-------------------|------------------|
| Разбавитель       | 15               |
| Реакционная смесь | 10               |
| Смесь ферментов   | 5                |

Рекомендуется готовить смесь реагентов не менее чем на 5 реакций. При приготовлении смеси , необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками.

10.1.4. Тщательно перемешать амплификационную смесь пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

10.1.5. Внести в приготовленные пробирки по 30 мкл полученной амплификационной смеси.

10.1.6. В пробирки с амплификационной смесью добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 20 мкл:

- а) в пробирку ОКО-ПЦР - разбавитель;
- б) в пробирку ОКО-выделения - отрицательный контрольный образец этапа выделения (при наличии);
- в) в пробирки исследуемых образцов - исследуемые образцы РНК;
- г) в пробирку положительного контрольного образца - ПКО.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует, по возможности, немедленно закрывать крышкой.

10.1.7. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

10.2. Проведение амплификации.

10.2.1. Перенести пробирки в амплификатор с детекцией результатов «в режиме реального времени» и провести амплификацию по следующей программе (ниже представлены программы амплификации для различных видов амплификаторов):

|                                |       |                                                                   |           |
|--------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| «CFX96» (BioRad)               | +42°C | 40 мин                                                            | 5 циклов  |
|                                | +95°C | 2 мин                                                             |           |
|                                | +95°C | 20 сек                                                            |           |
|                                | +64°C | 40 сек                                                            |           |
|                                | +95°C | 20 сек                                                            |           |
|                                | +64°C | 40 сек (считывание по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar705)      | 40 циклов |
| «ДТprime» (НПО ДНК-Технология) | +42°C | 40 мин                                                            | 5 циклов  |
|                                | +93°C | 2 мин                                                             |           |
|                                | +93°C | 20 сек                                                            |           |
|                                | +60°C | 40 сек                                                            |           |
|                                | +93°C | 20 сек                                                            |           |
|                                | +60°C | 40 сек (считывание по каналам FAM, HEX, FOX, Cy5, Cy5,5)          | 40 циклов |
|                                | +60°C | 40 сек (считывание по каналам Green, Yellow, Orang, Red, Crimson) |           |

11. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Детекция результатов

При проведении ОТ-ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» измерения осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

Флуоресцентный сигнал амплификации специфических фрагментов генотипов вируса гепатита С и внутреннего контроля регистрируется по следующим каналам:

Таблица 4.

| Канал          | FAM/Green | HEX/Yellow | ROX/Orange | Cy5/Red | Cy5,5/<br>Quasar705<br>/Crimson |
|----------------|-----------|------------|------------|---------|---------------------------------|
| Генотип<br>HCV | 1b        | 3          | 2          | 1a      | ВКО*                            |

\*консервативный участок генома вируса гепатита С.

Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов HCV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ, представлены в таблице 5 на примере амплификатора с детекцией в режиме «реального времени» ДТprime (ДНК-технология, Россия).

Таблица 5.

| Параметр           | Канал флуоресценции |           |           |            |           |
|--------------------|---------------------|-----------|-----------|------------|-----------|
|                    | FAM                 | HEX       | ROX       | Cy5        | Cy5,5     |
| РНК-мишень         | Генотип 1b          | Генотип 3 | Генотип 2 | Генотип 1a | ВКО - HCV |
| Пороговая<br>линия | 200                 | 100       | 30        | 100        | 5         |

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца (значение N/A или НД) означает, что пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не было.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

### 11.2. Интерпретация результатов

Интерпретация результатов анализа проводится только в том случае получения правильных значений Ct для контрольных образцов (указаны в таблице 6).

Таблица 6

| Образец           | Значение Ct             |                         |                         |                       |                                      |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
|                   | FAM/Green<br>Генотип 1b | HEX/Yellow<br>Генотип 3 | ROX/Orange<br>Генотип 2 | Cy5/Red<br>Генотип 1a | Cy5,5/Quasar705/Crimson<br>ВКО - HCV |
| ПКО               | <24                     | <24                     | <24                     | <24                   | <24                                  |
| ОКО-ПЦР           | НД                      | НД                      | НД                      | НД                    | НД                                   |
| ОКО-<br>выделения | НД                      | НД                      | НД                      | НД                    | НД                                   |

Примечание: НД – нет значения для образцов (значение N/A или НЗ).

В случае получения невалидных значений Ct для ПКО, требуется повтор постановки.

В случае получения невалидных значений Ct для ОКО-ПЦР, требуется повтор постановки после принятия антиконтаминационных мер.

В случае получения невалидных значений Ct для ОКО-выделения, требуется повтор анализа с этапа пробоподготовки.

Интерпретация результатов анализа с целью выявления и генотипирования РНК HCV проводится в соответствии с таблицей 7. Для положительных образцов важно убедиться, что кривая накопления флуоресцентного сигнала имеет характерную S-образную форму, в противном случае образец считается отрицательным.

Таблица 7.

| Значения Ct |
|-------------|
|-------------|

| Образец             | Каналы<br>FAM/Green<br>HEX/Yellow<br>ROX/Orange<br>Cy5/Red | Cy5,5/<br>Quasar705/<br>Crimson | Результат                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Исследуемый образец | <40                                                        | любой                           | ПРИСУТСТВИЕ РНК соответствующего генотипа вируса гепатита С.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                     | НЗ                                                         | <35                             | Генотип вируса гепатита С не определен, требуется дополнительный анализ образца: возможно наличие редкого генотипа HCV, либо мутаций в месте гибридизации олигонуклеотидов.                                                                                                                                                                                                                                  |
|                     | НЗ                                                         | НЗ или >35                      | Недостоверный результат, требуется повтор анализа образца.<br>Необходимо убедиться, что концентрация РНК HCV в образце более 1000 МЕ/мл. В случае концентрации РНК HCV в образце менее 1000 МЕ/мл определение генотипа невозможно по причине низкой вирусной нагрузки.<br>Рекомендуется повторить анализ образца с этапа пробоподготовки. Для анализа необходимо провести концентрирование образца в 10 раз. |

Примечание: НЗ – нет значения (значение N/A или НД).

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Условия хранения

Набор HCV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ должен храниться при температуре от -18 до -20 °С в течение всего срока годности. Срок годности наборов - 12 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

12.2. Транспортирование

Набор реагентов HCV-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в отапливаемых герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом, (условия транспортирования соответствуют условиям хранения) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств. Допустима транспортировка при температуре от +2 до +8°С в течение 3 дней (не более).

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

13. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НАБОРА

Предприятие-изготовитель проводит приемочные испытания для каждой производственной серии, осуществляя верификационный контроль основных аналитических характеристик (технические характеристики), внешний вид, комплектность, упаковку, маркировку, а также контроль качества сырья и компонентов.

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и

внешнего контроля качества лабораторных исследований по обнаружению РНК выявляемых микроорганизмов (например, панели ФСВОК, международные стандарты).

#### **14. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ**

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21. Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор. Отходы биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные отходы) из клинико-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, образцы материала после пробоподготовки (выделение ДНК) и отходы после проведения амплификации относятся к классу Б (эпидемически опасные отходы).

Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/ обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

#### **15. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ**

По вопросам, касающимся качества набора **НСУ-ИМБИАН-ПЦР-ДИФ**, следует обращаться в ООО «ИМБИАН ЛАБ» по адресу: 630559, Новосибирская обл., Г.О. Рабочий поселок Кольцово, РП Кольцово, ул. Садовая, д. 2/7, этаж 2, помещ. 2, телефон: 8-800-600-90-77, или e-mail: [info@imbian.ru](mailto:info@imbian.ru).

## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА УПАКОВКЕ И ЭТИКЕТКАХ

| Символ                                                                              | Наименование                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
|    | Изготовитель                                 |
|    | Дата изготовления                            |
|    | использовать до...                           |
|    | температурный диапазон                       |
|    | обратитесь к инструкции по применению        |
|   | код партии                                   |
|  | Беречь от влаги                              |
|  | Вверх                                        |
|  | Хрупкое, обращаться осторожно                |
|  | медицинское изделие для диагностики in vitro |
|  | Нестерильно                                  |
|  | номер по каталогу                            |

|                                                                                   |                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|  | содержимое достаточно для проведения n- количества тестов |
|  | Не использовать при поврежденной упаковке                 |
|  | Не допускать воздействия солнечного света                 |
|  | Запрет на повторное применение                            |
|  | Бережное обращение                                        |

Сшито и заверено печатью 16  
(методический лист)



Генеральный директор ООО «Имбиан лаб»  
Сидова В.В.