

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ООО «ИМБИАН ЛАБ»



Осипова В.В.

2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики in vitro
Набор реагентов для количественного выявления методом ОТ-ПЦР in vitro РНК вируса
гепатита С в пробах нуклеиновых кислот, выделенных из плазмы и сыворотки крови
«НСV-ИМБИАН-ПЦР Количественный» по ТУ 21.20.23-127-41390295-2021

Набор реагентов для количественного выявления методом ОТ-ПЦР in vitro РНК вируса гепатита С в пробах нуклеиновых кислот, выделенных из плазмы и сыворотки крови «НСV-ИМБИАН-ПЦР Количественный» по ТУ 21.20.23-127-41390295-2021 (далее по тексту набор, набор реагентов, набор реагентов НCV-ИМБИАН-ПЦР Количественный)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначен для количественного выявления РНК 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 (с антикоагулянтом К₂ЭДТА и цитратом натрия 3,8 %) и сыворотка крови).

Предназначен для диагностики in vitro при профессиональном применении с целью выявления наличия или отсутствия РНК вируса гепатита С (Hepatitis C Virus, HCV).

1.1 Функциональное назначение - Набор реагентов НCV-ИМБИАН-ПЦР Количественный предназначен для диагностики in vitro при профессиональном применении с целью выявления наличия или отсутствия РНК вируса гепатита С (Hepatitis C Virus, HCV).

Набор предназначен для обследования 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. Набор реагентов НCV-ИМБИАН-ПЦР Количественный может быть использован в клинической лабораторной диагностике для выявления носительства вирусного гепатита С, а также для контрольных исследований во время и после проведенного лечения.

Набор реагентов предназначен для однократного применения

Набор реагентов не нуждается в стерилизации

Набор предназначен для обследования всех групп населения любого возраста без градации по демографическому или популяционному признаку.

Противопоказания

Отсутствуют

Возможные побочные действия: при использовании медицинского изделия по инструкции по применению побочные действия не выявлены.

Предназначенный пользователь набора - сотрудники клинико-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ДНК диагностики (врач, лаборант, медицинский работник).

Перечень и описание материалов медицинского изделия, вступающих в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента (телом человека)

В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции. Отсутствуют материалы, вступающие в опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

Компоненты набора упакованы в коробку, в которую вложена инструкция по применению.

Программное обеспечение работы изделия

Отсутствует.

Техническое обслуживание и ремонт изделия

Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА - сотрудники клинико-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ДНК-диагностики (врач, лаборант, медицинский работник).

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор реагентов HCV-ИМБИАН-ПЦР Количественный выпускается в одном варианте исполнения.

Набор рассчитан на проведение 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.

Состав	Варианты фасовки
1. Реакционная смесь, готово для использования 1100 мкл.	1 пробирка - 1100 мкл
2. Разбавитель, готово для использования 1,8 мл.	1 пробирка - 1,8 мл
3. Смесь ферментов, готово для использования – 550 мкл.	1 пробирка - 550 мкл
4. Внутренний контрольный образец (ВКО), лиофилизат	1 пробирка - лиофилизат
5. Стандартный контрольный образец 1 (СКО 1), лиофилизат	1 пробирка - лиофилизат
6. Стандартный контрольный образец 2 (СКО 2), лиофилизат	1 пробирка - лиофилизат
7. Раствор для восстановления (РВ), готово для использования 1,8 мл	1 пробирка - 1,8 мл

8. Вкладыш с данными стандартных контрольных образцов	1 шт.
9. Инструкция	1 шт.

В состав комплектации набора входят готовые к применению реагенты.

В состав реакционной смеси входят:

- раствор дНТФ;
- ОТ-ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды: зонд для специфического фрагмента генома вируса гепатита С содержит флуорофор FAM, зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX.
- праймеры для выявления кДНК вируса гепатита С;
- праймеры для выявления внутреннего контроля; 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.

ВКО (внутренний контрольный образец) представляет собой РНК-мишень внутреннего контроля, используется на этапе пробоподготовки.

Стандартный контрольный образец представляет собой количественно охарактеризованную смесь кДНК-калибраторов (образцов кДНК-мишеней генома *HCV* и внутреннего контроля известной концентрации). Во вкладыше к каждой серии набора реагентов указана точная концентрация соответствующего калибратора в стандартном контрольном образце, а также диапазон допустимых значений циклов пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (C_t) для стандартного контрольного образца на различных типах амплификаторов.

4.2. Комплектность

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- инструкция по применению;
- вкладыш с данными стандартных контрольных образцов.
- паспорт (при необходимости, ГОСТ Р 51088-2013) предоставляется по запросу пользователя.

4.3. Принцип метода

Набор реагентов HCV-ИМБИАН-ПЦР Количественный основан на использовании метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для определения специфических участков РНК вируса гепатита С 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 её регистрацию на флуоресцентном детекторе.

При проведении регистрации продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени») измерения 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). Значение Ct обратно пропорционально концентрации ДНК в образце. Возможность количественного определения РНК *HCV* в режиме «реального времени» основывается на существовании зависимости между исходной концентрацией кДНК-мишени, а следовательно и РНК, в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (Ct).

Для проведения количественного теста амплификацию кДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с калибраторами с известной концентрацией кДНК-мишени.

Анализ результатов происходит при помощи калибровочной прямой, построенной по двум калибровочным образцам. После выставления настроек анализа, программное обеспечение амплификатора автоматически определяет Ct (пороговый цикл как точку пересечения графика накопления ДНК и пороговой линии) всех образцов, проводит построение калибровочной прямой по соответствующим стандартным образцам и определяет по ней концентрацию анализируемого образца.

4.4. Метрологическая прослеживаемость значений концентрации калибраторов, входящих в состав стандартных контрольных образцов, проведена до уровня контрольного образца предприятия (калибратора второго порядка), изготовленного из кДНК геномной РНК *HCV*. Концентрацию контрольного образца предприятия определяют стандартизированной методикой количественной ОТ-ПЦР с использованием международного количественно охарактеризованного стандарта (6th WHO International Standard for HCV RNA for NAT, 18/184C NIBSC). Коммутабельность контрольных образцов предприятия подтверждена результатами измерения концентрации кДНК референтной и рутинной методиками, предназначенными для измерения показателей концентрации при количественном исследовании НК, выделенной из соответствующих клинических образцов

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, а также занижение реального содержания РНК возбудителя в клиническом образце.

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, HBV, HDV, HIV, HSV1 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 pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leprosira* spp., *Haemophilus influenza*, *Treponemapallidum* в концентрации в диапазоне 5×10^4 - 5×10^6 МЕ/мл, а также геномной ДНК человека в концентрации в диапазоне 1×10^7 - 5×10^7 МЕ/мл.

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>	$2,1 \times 10^6$
<i>Streptococcus salivarius</i>	$3,5 \times 10^6$
<i>Enterococcus faecium</i> ,	$8,3 \times 10^5$
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	$9,2 \times 10^5$
<i>Staphylococcus aureus</i> .	$6,2 \times 10^5$
<i>Streptococcus pyogenes</i>	$1,1 \times 10^6$
ДНК человека	$9,1 \times 10^5$
<i>Escherichia coli</i>	$3,5 \times 10^6$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$7,2 \times 10^5$
<i>Candida albicans</i>	$5,9 \times 10^5$
<i>Leprosira</i> spp.	$7,9 \times 10^4$
<i>Neisseria meningitidis</i>	$4,2 \times 10^5$
<i>Haemophilus influenza</i>	$1,1 \times 10^6$
ДНК человека	$8,6 \times 10^5$
<i>Moraxella catarrhalis</i>	$4,2 \times 10^5$
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	$2,7 \times 10^5$

<i>Treponemapallidum</i>	$1,4 \cdot 10^5$
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	$2,3 \cdot 10^5$
ДНК человека	$7,3 \cdot 10^5$
<i>HSV 1 титра</i>	$4,7 \cdot 10^5$
<i>HSV 2 титра</i>	$4,4 \cdot 10^5$
<i>CMV</i>	$1,3 \cdot 10^5$
ДНК человека	$8,1 \cdot 10^5$
<i>EBV</i>	$6,4 \cdot 10^5$
<i>VZV</i>	$1,7 \cdot 10^5$
<i>Adenovirus</i>	$2,2 \cdot 10^5$
<i>Parvovirus</i>	$4,6 \cdot 10^5$
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 HCV-ИМБИАН-ПЦР Количественный можно обнаружить 100 и более МЕ/мл вируса гепатита С, присутствующего в прошедшей обработке (выделение РНК) пробе.

5.3. Тест на прецизионность

Тест на прецизионность характеризуется рассеянием значений измеренных концентраций, получаемых при использовании набора относительно величины средней концентрации. Для образца с концентрацией 1×10^5 МЕ/мл для HCV коэффициент вариации составляет не более 10%.

5.4. Тест на правильность определения концентрации

Тест на правильность определения - при детекции образцов с концентрациями 1×10^8 , 1×10^5 и 5×10^2 МЕ/мл для HCV процент отклонения измеренной концентрации от значения, принимаемого за истинное, находится в диапазоне 90-110%.

5.5. Диапазон линейности

Диапазон линейности - это диапазон концентраций, при детекции которых зависимость между значениями Ct и log концентрации удовлетворяет линейной модели. Модуль коэффициента корреляции для образцов с концентрациями 1×10^8 , 1×10^5 и 5×10^2 МЕ/мл для HCV составляет не менее 0,99. Таким образом, диапазон линейности для РНК HCV составляет от 5×10^2 до 1×10^8 МЕ/мл.

5.6 Диапазон измерения

Диапазон измерения составляет $5 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^8$ МЕ/мл согласно диапазону линейности.

5.7 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 10^2 МЕ/мл с вероятностью ложного утверждения об отсутствии компонента (концентрация РНК ис-комого анализата (HCV)) равной 5 % (доверительная вероятность предела обнаружения равна 95%), согласно аналитической чувствительности

5.8 Предел количественного обнаружения

Предел количественного обнаружения составляет $5 \cdot 10^2$ МЕ/мл согласно диапазону линейности.

5.9 Показание холостой пробы

Показание холостой пробы – отсутствие обнаружения по каналам FAM и HEX.

5.10 Повторяемость и воспроизводимость

Повторяемость и воспроизводимость охарактеризована коэффициентом вариации. Согласно тесту на прецизионность коэффициент вариации составляет не более 10 %.

6 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

6.1. **Диагностическая (клиническая) чувствительность** выявления РНК вируса гепатита С: 100 % (интервал 97,4 % -100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.2. **Диагностическая специфичность** выявления РНК вируса гепатита С: 100 % (интервал 97,2% -100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

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

Клинический материал	Количество образцов от пациентов	Количество положительных образцов	Результаты испытаний	
			Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Плазма крови	231	126	100% (95% ДИ: 97,7-100%)	100% (95% ДИ: 97,2-100%)
Сыворотка крови	227	115	100% (95% ДИ: 97,4-100%)	100% (95% ДИ: 97,4-100%)

6.4. Корреляция результатов

Показана высокая степень корреляции результатов измерения концентрации РНК *НСV*, полученных с помощью наборов реагентов «**Набор реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса гепатита С методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией ПОЛИВИР НCV Количественный (РЗН 2021/144058)**» и **НСV-ИМБИАН-ПЦР Количественный**.

Разница между значениями концентрации РНК *НСV* в образцах плазмы крови не превышала 0,5 Ig в 96,4% случаев. Превышение разницы между значениями концентрации РНК *НСV* в образце 0,5 Ig отмечалась в 3,6% случаев. Разница между результатами не превышала 1,1 Ig.

Разница между значениями концентрации РНК *НСV* в образцах сыворотки крови не превышала 0,5 Ig в 97,0% случаев. Превышение разницы между значениями концентрации РНК *НСV* в образце 0,5 Ig отмечалась в 3,0% случаев. Разница между результатами не превышала 1,1 Ig.

Рассчитанный коэффициент корреляции Спирмена составил 0,98 ($p < 0,001$), что свидетельствует о значительном сходстве (эквивалентности) сравниваемых тест-систем.

6.5. Воспроизводимость результатов исследования с использованием набора НCV-ИМБИАН-ПЦР Количественный составляет 100% и подтверждена в ходе проведения клинических испытаний на заявленных термоциклерах и разных сериях набора (внутрисерийная, межсерийная и внутривыпускная воспроизводимость). Коэффициент вариации измерения концентрации для одного и того же образца не превышает 10%.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора - класс 3 (по номенклатурной классификации медицинских изделий по классам в зависимости от потенциального риска их применения, Приказ Минздрава России от 06.06.2012 №4н).

7.1 Требования безопасности при работе с набором

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».

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 III-IV групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- 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 входят 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

- Амплификатор «ДТпрайм» в модификации 4М1 (РУ № ФСР 2011/10229) производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия
- набор реагентов для проведения ОТ-ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- 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;
- одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 1,5 или 2,0 мл;

- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- бесцветные одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации;
- «перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.
- набор для выделения нуклеиновых кислот: Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала НК-сорбент для диагностики *in vitro* по ТУ 21.20.23-232-17253567-2018 (ПУ № 2019/9331)

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

9.1 Материал для исследования.

Материалом для исследования набором реагентов HCV-ИМБИАН-ПЦР Количественный являются образцы РНК, выделенные из клинических проб (сыворотка и плазма крови).

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 Количественный для полного цикла исследования образцов.

Для выделения РНК необходимо при экстракции вместе с исследуемым образцом внести 5 мкл восстановленного ВКО из набора реагентов HCV-ИМБИАН-ПЦР Количественный. 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 Количественный являются образцы РНК, выделенные из клинических проб. Анализ рисков показал, что возможными ошибками применения набора реагентов HCV-ИМБИАН-ПЦР Количественный 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 (50% и более по объему) 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» (ООО НПФ «Литех», РЗН 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	гемоглобин	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 HCV-ИМБИАН-ПЦР Количественный 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 HEX (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 компонентов к проведению анализа

Перед первым использованием набора необходимо восстановить образец ВКО и Стандартные контрольные образцы 1 и 2!

10.1.1 Пробирки с лиофилизированными образцами ВКО (внутренним контрольным образцом) и Стандартными контрольными образцами 1 и 2 кратко центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе для позиционирования содержимого на дне пробирки.

10.1.2. Добавить в пробирку с ВКО 650 мкл Раствора для восстановления. Растворять образец не менее 10 минут, периодически перемешивая на вортексе.

Приготовленный таким образом ВКО использовать в процедуре экстракции РНК.

Восстановленный ВКО хранить при температуре от +2 до +8°C в течение 12 месяцев. Не замораживать!

10.1.3. Добавить в пробирки со Стандартными контрольными образцами 1 и 2 по 400 мкл Раствора для восстановления. Растворять образцы не менее 20 минут, периодически перемешивая на вортексе.

Восстановленные Стандартные контрольные образцы 1 и 2 хранить при температуре от -18 до -20 °C в течение 12 месяцев.

10.2 Подготовка к проведению амплификации.

10.2.1. Приготовить необходимое число бесцветных пробирок вместимостью 0,2 мл, включая пробирки для стандартных контрольных образцов 1 и 2 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.

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

10.2.3. Из компонентов набора приготовить амплификационную смесь из расчета на 1 образец (табл.4):

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.

10.2.4. Перемещать амплификационную смесь пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

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

10.2.6. 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 пробирки стандартных контрольных образцов - соответствующие стандартные контрольные образцы 1 и 2.

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

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

10.3 Проведение амплификации.

10.3.1. Перенести пробирки в амплификатор с детекцией результатов «в режиме реального времени» и провести амплификацию по следующей программе (ниже представлена программа амплификации для амплификатора ДТпрайм):

+42°C	40 мин	
+93°C	2 мин	
+93°C	20 сек	5 циклов
+60°C	40 сек	
+93°C	20 сек	40 циклов
+60°C	40 сек (считывание по каналам HEX)	

****Оптимизация всех красителей перед первым считыванием!***

10.3.2. Для автоматического расчета концентрации РНК *HCV* программным обеспечением прибора необходимо при формировании схемы образцов назначить стандартным контрольным образцам тип «Стандарт» и задать их концентрацию в МЕ/мл. Программное обеспечение представленных амплификаторов позволяет редактировать описание образца после выполнения программы амплификации.

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.

Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов HCV-ИМБИАН-ПЦР количественный, представлены в таблице 5 на примере амплификатора с детекцией в режиме реального времени (ДТпрайм).

Таблица 5.

Параметр	Канал флуоресценции	
	FAM	HEX
Baseline threshold	100	20
Конечный цикл (КЦ)	35	25

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,НЗ) означает, что пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла (КЦ). Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Для количественного анализа программа автоматически проведет построение калибровочной прямой, исходя из заданных концентраций стандартных контрольных образцов, и рассчитает концентрацию РНК в исследуемом образце.

11.2. Интерпретация результатов

11.2.1. Количественное определение РНК HCV в анализируемом образце.

Количественный анализ содержания РНК HCV в анализируемых образцах проводится только в случае получения правильных значений Ct для контрольных образцов (указаны в таблице 6).

Таблица 6

Образец	Значения Ct	
	Канал FAM/Green (HCV)	Канал HEX/Yellow (ВКО)
Стандартный контрольный образец 1	Диапазон указан во вкладыше к набору.	
Стандартный контрольный образец 2		
ОКО-ПЦР	НЗ	любой
ОКО-выделения	НЗ	<КЦ

Примечание: НЗ - нет значения (значение N/A или НД), К Ц - конечный цикл.

В случае получения невалидных значений Ct для стандартных контрольных образцов, 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.

Заключение по результатам выявления и количественной оценки содержания РНК HCV в анализируемых образцах с помощью программного обеспечения прибора проводится согласно таблице 7. Точное указание концентрации РНК HCV возможно только для

рассчитанных значений, находящихся в диапазоне линейности набора. Для положительных образцов важно убедиться, что кривая накопления флуоресцентного сигнала имеет характерную S-образную форму, в противном случае образец считается отрицательным.

Таблица 7.

Рассчитанная концентрация РНК HCV по каналу FAM/Green	Значение Ct по каналу HEX/Yellow	Заключение
Любая	НЗ или > КЦ	РНК HCV ОБНАРУЖЕНА. Однако образец не пригоден для количественного анализа. ТРЕБУЕТСЯ повторить анализ образца с этапа пробоподготовки
В диапазоне линейности, от 5×10^2 до 1×10^8 МЕ/мл	<КЦ	РНК HCV ОБНАРУЖЕНА, указывается рассчитанная концентрация МЕ/мл.
Не менее 5×10^2 , но не более 1×10^8 МЕ/мл	<КЦ	РНК HCV ОБНАРУЖЕНА, концентрация менее 5×10^2 МЕ/мл Для определения точной концентрации РНК HCV в клиническом образце, рекомендуется повторить анализ образца с этапа пробоподготовки. Для анализа необходимо провести концентрирование образца в 10 раз.
более 1×10^8 МЕ/мл	<КЦ	РНК HCV ОБНАРУЖЕНА, концентрация более 1×10^8 МЕ/мл. Для определения точной концентрации РНК HCV в клиническом образце, рекомендуется повторить анализ образца с этапа пробоподготовки. Для анализа необходимо развести образец в 10 раз.
Менее 100 МЕ/мл	<КЦ	Подозрение на присутствие РНК HCV. Рекомендуется повторить анализ образца с этапа пробоподготовки. Для анализа необходимо провести концентрирование образца в 10 раз.
Не определена	<КЦ	ОТСУТСТВИЕ РНК вируса

		гепатита С.
Не определена	НЗ или > КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение РНК. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

Примечание: НЗ - нет значения (значение N/A или НД), КЦ - конечный цикл.

Внимание! Рассчитанная концентрация РНК HCV в анализируемой пробе отличается от фактической концентрации РНК HCV в клиническом образце, если при выделении РНК HCV объем раствора для элюции не соответствует объему образца сыворотки или плазмы крови, взятому на выделение. В этих случаях при выдаче заключения следует учитывать фактор концентрирования или разведения образца.

Для этого необходимо вычислить коэффициент X по следующей формуле:

$$X = \frac{\text{Объем образца, взятого на выделение (мкл)}}{\text{Объем добавленного раствора для элюции (мкл)}}$$

X= Объем образца, взятого на выделение (мкл)/Объем добавленного раствора для элюции (мкл)

И далее определить фактическую концентрацию РНК HCV в клиническом образце по формуле:

$$\text{Фактическая концентрация ДНК HBV} = \frac{\text{Рассчитанная концентрация ДНК HBV}}{X}$$

Рассчитанная концентрация РНК HCV

Фактическая концентрация РНК HCV = Рассчитанная концентрация РНК HCV/X.

Точное указание фактической концентрации РНК HCV возможно только для случаев рассчитанной концентрации РНК HCV, определенной в диапазоне линейности от 5×10^2 до 1×10^8 МЕ/мл.

Примечание: Референсное значение – не обнаружено

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

НАБОРА 12.1. Условия хранения

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

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 Количественный транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в отапливаемых герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств. Условия транспортирования соответствуют условиям хранения. 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 клиничко-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 HCV-ИМБИАН-ПЦР Количественный, 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, e-mail: 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
	осторожно! обратитесь к инструкции по применению
	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

Сшито и заверено печатью do
Имбиан лист об



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