

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НПФ «Литех»

А.Ю. Наумов

20 г.

ООО НПФ «Литех»

Набор реагентов для выявления и дифференциации
генотипов вируса гепатита С методом полимеразной цепной
реакции с обратной транскрипцией
ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП
по ТУ 21.20.23-1804-17253567-2020

ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП

Маркировка набора реагентов

01804-PB	ООО НПФ "Литех"
119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1, стр. 3	
Набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса гепатита С методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией	
ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП	
ТУ 21.20.23-1804-17253567-2020 РЗН	
Для профессионального применения	
Обратитесь к инструкции по применению на www.lytech.ru	
Хранить при -18...-20°C	Серия 02/1804/20
Транспортировать при -18...-20°C	Годеи до: 16.04.21
Только для in vitro диагностики	

ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП

Состав набора:

1 Реакционная смесь	1 пробирка x 1100 мкл
2 Разбавитель	1 пробирка x 1,8 мл
3 Смесь ферментов	1 пробирка x 550 мкл
4 ПКО	1 пробирка x 400 мкл

Серия 02/1804/20

Годеи до: 16.04.21

Серия 02/1804/20

Дата изготовления: 16.04.20

Годеи 16.04.21

Маркировка внутренней упаковки

01804-PB	ООО НПФ "Литех"
119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1, стр. 3	
Набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса гепатита С методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией	
ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП	
ТУ 21.20.23-1804-17253567-2020 РЗН	
Для профессионального применения	
Обратитесь к инструкции по применению на www.lytech.ru	
Хранить при -18...-20°C	Серия 02/1804/20
Транспортировать при -18...-20°C	Годеи до: 16.04.21
Только для in vitro диагностики	

ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП

Состав набора:

1 Реакционная смесь	1 пробирка x 1100 мкл
2 Разбавитель	1 пробирка x 1,8 мл
3 Смесь ферментов	1 пробирка x 550 мкл
4 ПКО	1 пробирка x 400 мкл

Серия 02/1804/20

Годеи до: 16.04.21

ООО НПФ "Литех"	
ПКО	
1 пробирка	
Серия 02/1804/20	
Годеи до: 16.04.21	
Хранить при -18...-20°C	
Только для in vitro диагностики	

ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП

Маркировка компонентов набора

ООО ЦРМИ "Ланет"

Реакционная смесь

1100 мл

Серия 02/1804/20

Годен до 16.04.21

Хранить при -18 - 20°C

Только для in vitro диагностики

КОМПОНЕНТ НАУЧ. ГЕНЕТИКИ

ООО ЦРМИ "Ланет"

Разбавитель

1,8 мл

Серия 02/1804/20

Годен до 16.04.21

Хранить при -18 - 20°C

Только для in vitro диагностики

КОМПОНЕНТ НАУЧ. ГЕНЕТИКИ

ООО ЦРМИ "Ланет"

Смесь ферментов

550 мл

Серия 02/1804/20

Годен до 16.04.21

Хранить при -18 - 20°C

Только для in vitro диагностики

КОМПОНЕНТ НАУЧ. ГЕНЕТИКИ

ООО ЦРМИ "Ланет"

ПКО

400 мкл

Серия 02/1804/20

Годен до 16.04.21

Хранить при -18 - 20°C

Только для in vitro диагностики

КОМПОНЕНТ НАУЧ. ГЕНЕТИКИ

Образец маркировки групповой упаковки

Набор реагентов для выявления и дифференциации
генотипов вируса гепатита С методом полимеразной цепной
реакции с обратной транскрипцией
ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП

Номер серии 02/1804/20

Дата изготовления 16.04.20

Годен до 16.04.21

Число единиц потребительской упаковки _____

Масса нетто _____

Масса брутто _____

Масса нетто потребительской упаковки _____

Условия хранения:

Набор реагентов **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** должен храниться при температуре -18...-20°C в течение всего срока годности. Срок годности набора – 12 месяцев.

Условия транспортировки:

Набор реагентов **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** рекомендуется транспортировать при температуре хранения. Допустима транспортировка при температуре +2°...+8°C в течение трех дней (не более).

Копия на _____ листах верна.

Директор ООО НПФ «Литех»

Наумов А.Ю.



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НПФ «Литех»

А.Ю. Наумов

20 г.



ООО НПФ «Литех»

Набор реагентов для выявления и дифференциации
генотипов вируса гепатита С методом полимеразной цепной
реакции с обратной транскрипцией
ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП
по ТУ 21.20.23-1804-17253567-2020

ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП

Маркировка набора реагентов

01804-PB	ООО НПФ "Литех"
119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1, стр. 3	
Набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса гепатита С методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией	
ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП	
ТУ 21.20.23-1804-17253567-2020 РЗН	
Для профессионального применения Обратитесь к инструкции по применению на www.lytech.ru	
Хранить при -18...-20°C	Серия 02/1804/20
Транспортировать при -18...-20°C	Годеи до: 16.04.21
Только для in vitro диагностики	

ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП Состав набора:

1	Реакционная смесь	1 пробирка x 1100 мкл
2	Разбавитель	1 пробирка x 1.8 мл
3	Смесь ферментов	1 пробирка x 550 мкл
4	ПКО	1 пробирка x 400 мкл

Серия 02/1804/20
Годеи до: 16.04.21

Серия 02/1804/20
Дата изготовления: 16.04.20
Годеи 16.04.21

Маркировка внутренней упаковки

01804-PB	ООО НПФ "Литех"
119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1, стр. 3	
Набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса гепатита С методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией	
ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП	
ТУ 21.20.23-1804-17253567-2020 РЗН	
Для профессионального применения Обратитесь к инструкции по применению на www.lytech.ru	
Хранить при -18...-20°C	Серия 02/1804/20
Транспортировать при -18...-20°C	Годеи до: 16.04.21
Только для in vitro диагностики	

ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП Состав набора:

1	Реакционная смесь	1 пробирка x 1100 мкл
2	Разбавитель	1 пробирка x 1.8 мл
3	Смесь ферментов	1 пробирка x 550 мкл
4	ПКО	1 пробирка x 400 мкл

Серия 02/1804/20
Годеи до: 16.04.21

ООО НПФ "Литех"
ПКО
1 пробирка
Серия 02/1804/20
Годеи до: 16.04.21
Хранить при -18...-20°C
Только для in vitro диагностики

Маркировка компонентов набора

ООО НПФ "Липецк"

Реакционная смесь

1100 мл

Серия 02/1804/20
Годен до 16.04.21
Хранить при -10...20°C
Только для in vitro диагностики

КОМПОНЕНТ НАСТУП. ГИСТОТИП

ООО НПФ "Липецк"

Разбавитель

1.8 мл

Серия 02/1804/20
Годен до 16.04.21
Хранить при -10...20°C
Только для in vitro диагностики

КОМПОНЕНТ НАСТУП. ГИСТОТИП

ООО НПФ "Липецк"

Смесь ферментов

350 мкл

Серия 02/1804/20
Годен до 16.04.21
Хранить при -10...20°C
Только для in vitro диагностики

КОМПОНЕНТ НАСТУП. ГИСТОТИП

ООО НПФ "Липецк"

ПКО

400 мкл

Серия 02/1804/20
Годен до 16.04.21
Хранить при -10...20°C
Только для in vitro диагностики

КОМПОНЕНТ НАСТУП. ГИСТОТИП

Образец маркировки групповой упаковки

Набор реагентов для выявления и дифференциации
генотипов вируса гепатита С методом полимеразной цепной
реакции с обратной транскрипцией
ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП

Номер серии 02/1804/20Дата изготовления 16.04.20Годен до 16.04.21

Число единиц потребительской упаковки _____

Масса нетто _____

Масса брутто _____

Масса нетто потребительской упаковки _____

Условия хранения:

Набор реагентов **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** должен храниться при температуре -18...-20°C в течение всего срока годности. Срок годности набора – 12 месяцев.

Условия транспортировки:

Набор реагентов **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** рекомендуется транспортировать при температуре хранения. Допустима транспортировка при температуре +2°...+8°C в течение трех дней (не более).

Копия на 3 листах верна.

Директор ООО НПФ «Литех»
Наумов А.Ю.

A blue circular stamp of LLC NPF 'LITEX' is located in the upper right quadrant. The stamp contains the text 'ООО НПФ «ЛИТЕХ»' around the top inner edge, 'LITEX' in large letters in the center, 'Co. Ltd.' below it, and 'г. МОСКВА' at the bottom. A blue ink signature is written over the stamp.

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 ниже.

Образец	Значения Ct		Результат
	Каналы FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	Канал Cy5.5/Quasar705/Crimson	
Исследуемый образец	< 40	любой	ПРИСУТСТВИЕ РНК соответствующего генотипа вируса гепатита С.
	H3	< 35	Генотип вируса гепатита С не определен, требуется дополнительный анализ образца: возможно наличие редкого генотипа HCV, либо мутаций в месте гибридизации олигонуклеотидов.
	H3	H3 или > 35	Недостовверный результат, требуется повтор анализа образца

Примечание: H3 – нет значения (значение N/A или H/D).

С помощью набора ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП можно обнаружить 1000 и более МЕ/мл каждого генотипа вируса гепатита С, присутствующего в прошедшей обработку (выделение РНК) пробе;

По всем вопросам обращайтесь в офис компании ООО НПФ «Литех»:
 многоканальный телефон (499) 258-39-47, e-mail: info@lytech.ru
 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, дом 1, строение 3



ПАМЯТКА Подписи

по применению набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса гепатита С методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией
ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП.



Набор реагентов ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП предназначен для одновременного 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, содержащие HCV).

1. Подготовка к проведению амплификации.

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.

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).

1.2. Полностью разморозить компоненты из набора. Пробирки с реакционной смесью и разбавителем тщательно перемешать.

1.3. Из компонентов набора приготовить амплификационную смесь из расчета на 1 пробу:

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.

1.4. Перемешать амплификационную смесь пипетированием или импульсным вортиксованием в течение 10 секунд.

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

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.

1.7. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортке.

2. Проведение амплификации.

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).

Для работы с набором используются каналы FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5,5/Quasar705/Crimson.

«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)	

«ДТprime» (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)	

«Rotor-Gene Q» (Qiagen)	+37°C	40 мин	5 циклов
	+95°C	5 мин	
	+95°C	20 сек	
	+60°C	40 сек	
	+95°C	20 сек	
	+60°C	40 сек (считывание)*	

*Оптимизация всех красителей перед первым считыванием!

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

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

* консервативный участок генома вируса гепатита С.

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора (www.lytech.ru).

3. Анализ результата.

После завершения программы амплификации применить следующие настройки:

Амплификатор	Параметр	Канал флуоресценции				
		FAM/Green	HEX/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red	Cy5,5/Quasar705/Crimson
CFX96 (Bio Rad)	Analyze Data from Cycle 5 to 40 Baseline Setting – Apply Fluorescence Drift Correction					
	Baseline threshold	100	200	100	50	20
Rotor-Gene Q (Qiagen)	Dynamic Tube	on	on	on	on	on
	Slope correct	on	on	on	off	on
	Ignore first	5	0	0	0	0
	Baseline threshold	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
	Outer removal	5%	5%	10%	5%	5%
	Eliminate cycles before	10	10	10	10	10
ДТprime (ДНК-технология)	Baseline threshold	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.

4. Интерпретация результата.

Интерпретация результатов анализа проводится только в случае получения правильных значений Ct для контрольных образцов.

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

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

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ООО НПФ «Литех»

А.Ю.Наумов

2021 г.

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
Набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса гепатита С
методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией
ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

• 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:

- Таq-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-мишенной генома вируса гепатита С и его генотипов 1a, 1b, 2, 3.

4.2. Комплектность

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- памятка по применению набора.

Паспорт предоставляется по запросу пользователя.

Полная инструкция по применению представлена на сайте производителя www.lytech.ru (ГОСТ 51088). На бумажном носителе инструкция предоставляется по запросу пользователя.

4.3. Принцип метода

Набор реагентов **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** 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 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 рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Cycle threshold, Ct).

4.4. Метрологическая прослеживаемость значений концентрации контрольных образцов набора реагентов проведена 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 (6th WHO International Standard for HCV RNA for NAT, 18/184 NIBSC). Коммутабельность контрольных образцов предприятия подтверждена результатами измерения концентрации и генотипирования НК референтной и рутинной методиками, предназначенными для измерения показателей концентрации или видоспецифичного анализа генетической последовательности, соответственно, при 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.

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*, *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 pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leprosira spp.*, *Haemophilus influenza*, *Treponema pallidum*, а также геномной ДНК человека в концентрациях 10^5 - 10^7 ГЭ/мл. Отсутствие перекрестных реакций между генотипами *HCV* доказана производителем при исследовании высококонцентрированных образцов РНК *HCV* 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%.

5.2. Аналитическая чувствительность

С помощью набора **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** можно обнаружить 1000 и более МЕ/мл каждого генотипа вируса гепатита С, присутствующего в прошедшей обработку (выделение РНК) пробе.

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 специфичность выявления РНК вируса гепатита С генотипа 1b: 100 % (интервал 98,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления РНК вируса гепатита С генотипа 2: 100 % (интервал 98,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления РНК вируса гепатита С генотипа 3: 100 % (интервал 98,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.3. Показана тождественность диагностических характеристик набора **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** 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 результатов исследования с использованием набора **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** составляет 100% и подтверждена в ходе проведения клинических испытаний на разных сериях набора (внутрисерийная, межсерийная и внутримежсерийная воспроизводимость). Коэффициент вариации измерения Ct по соответствующим каналам флуоресценции для одного и того же образца (как положительного, так и отрицательного) не превышает 2%.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 3.

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 СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» 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 СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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.

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

- набор 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;
- 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 0,2 мл для амплификации;
- 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 **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** являются образцы РНК, выделенные из клинических проб (сыворотка и плазма крови с установленным содержанием РНК *HCV*). Для установления содержания РНК *HCV* в образцах могут быть

использованы любые зарегистрированные на территории РФ наборы реагентов для выявления РНК вируса гепатита С в плазме и сыворотке 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 +4...+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 **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** 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 **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** являются образцы РНК, выделенные из клинических проб. Анализ рисков показал, что возможными ошибками применения набора реагентов **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** 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 № 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 **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** 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 (табл.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. Перемешать амплификационную смесь пипетированием или импульсным вортиксованием 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:

- в пробирку ОКО-ПЦР – разбавитель;
- в пробирку ОКО-выделения - отрицательный контрольный образец этапа выделения (при наличии);
- в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы РНК;
- 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	
+95°C	2 мин	
+95°C	20 сек	5 циклов
+64°C	40 сек	
+95°C	20 сек	40 циклов
+64°C	40 сек (считывание по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar705)	

«DTprime» (ДНК-Технология)

+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 FAM, HEX, ROX, Cy5, Cy5,5)	

«Rotor-Gene Q» (Qiagen)

+37°C	40 мин	
+95°C	5 мин	
+95°C	20 сек	5 циклов
+60°C	40 сек	
+95°C	20 сек	40 циклов
+60°C	40 сек (считывание по каналам Green, Yellow, Orange, Red, Crimson)*	

**Оптимизация всех красителей перед первым считыванием!*

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора (www.lytech.ru).

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/Quasar705/Crimson
Генотип HCV	1b	3	2	1a	BKO*

* консервативный участок генома вируса гепатита С.

Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП**, 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
Baseline threshold	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 случае получения правильных значений Ct для контрольных образцов (указаны в таблице 6).

Таблица 6.

Образец	Значения Ct				
	FAM/Green Генотип 1b	HEX/Yellow Генотип 3	ROX/Orange Генотип 2	Cy5/Red Генотип 1a	Cy5,5/Quasar705/Crimson BKO - HCV *
ПКО	< 24	< 24	< 24	< 24	< 24
ОКО-ПЦР	НЗ	НЗ	НЗ	НЗ	НЗ
ОКО-выделения	НЗ	НЗ	НЗ	НЗ	НЗ

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

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.

Образец	Значения Ct		Результат
	Каналы FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	Канал Cy5,5/ Quasar705/ Crimson	

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 <i>HCV</i> , либо мутаций в месте гибридизации олигонуклеотидов.
	НЗ	НЗ или > 35	Недостоверный результат, требуется повтор анализа образца. Необходимо убедиться, что концентрация РНК <i>HCV</i> в образце более 1000 МЕ/мл. В случае концентрации РНК <i>HCV</i> в образце менее 1000 МЕ/мл определение генотипа невозможно по причине низкой вирусной нагрузки. 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 **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** должен храниться при температуре -18...-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 **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП** 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 +2...+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 контролей 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 2.1.7.2790-10.

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 **ПОЛИВИР HCV ГЕНОТИП**, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (499)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 11 ЛИСТОВ

«03» 03 20121 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов

шт.

Директор

Наумов А.Ю.



ВЕКТОР



**Набор реагентов
для выделения нуклеиновых
кислот из сыворотки (плазмы)
крови**

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

РеалБест экстракция 1000

НАБОР РЕАГЕНТОВ

C-8895

Набор реагентов «РеалБест экстракция 1000» предназначен для выделения нуклеиновых кислот из сыворотки (плазмы) крови.

Набор реагентов «РеалБест экстракция 1000» может быть применён в клинической практике при диагностике различных инфекций и заболеваний человека, при оценке эффективности лечения, а также для высокочувствительного скринирования донорской крови и определения вирусной нагрузки и оценки эффективности противовирусной терапии методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) или методом обратной транскрипции, с последующей полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

Набор рассчитан на выделение нуклеиновых кислот из 48 образцов, включая контрольные образцы. Обеспечивает возможность проведения до 8 независимых процедур выделения по 6 образцов в каждой, включая контроли.

Набор предназначен для применения с наборами для определения нуклеиновых кислот (ДНК либо РНК) возбудителей инфекций серии «РеалБест».

1. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

1.1. Принцип действия.

Принцип действия набора «РеалБест экстракция 1000» состоит в температурной обработке пробы многокомпонентным лизирующим раствором, разрушающим комплекс нуклеиновых кислот с белками, с последующим спиртовым осаждением нуклеиновых кислот на магнитные частицы, спиртовыми отмывками и последующей элюцией. После этого проба готова к постановке реакции ПЦР или ОТ-ПЦР.

Принцип анализа основан на выделении нуклеиновых кислот из пробы совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом и проведении реакции обратной транскрипции и амплификации выбранного фрагмента РНК или амплификации выбранного фрагмента ДНК с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Применённый в наборе метод дополнительного концентрирования нуклеотидного материала позволяет повысить чувствительность детекции.

Для удобства пользователя при работе с набором рекомендуется применение магнитного штатива. Возможно выделение нуклеиновых кислот из 1 и 0.5 мл сыворотки (плазмы) крови.

В состав ПЦР наборов серии «РеалБест»

входит **положительный контрольный образец (ПКО)**, соответствующий данному ПЦР набору. ПКО должен проходить процедуру выделения наравне с биологическими пробами и отрицательным контрольным образцом.

1.2. Состав набора:

Комплект реагентов для выделения НК:

- концентрирующий раствор – 4 фл. по 14 мл;
- лизирующий раствор № 1 – 4 фл. по 4 мл;
- лизирующий раствор № 2 – 8 фл. по 4 мл;
- осадитель НК – 4 фл. по 12 мл;
- раствор для отмывки № 1 – 4 фл. по 8 мл;
- раствор для отмывки № 2 – 4 фл. по 5 мл;
- элюирующий раствор – 4 фл. по 3 мл;
- сорбент (суспензия магнитных частиц) – 1 фл., 1 мл;

Комплект контрольных образцов:

- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 2 фл. по 4 мл;
- отрицательный контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека (ОКО) – 3 фл, 12 мл;
- внутренний контрольный образец (лиофилизированный концентрат), (ВКО) – 2 фл.;

2. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

2.2. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

2.3. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатитов или другие возбудители вирусных инфекций.

2.4. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

3. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01-«Ламинар-с» производства ЗАО «Ламинарные системы»);
- холодильник на (2-8)°С и минус 20°С (Атлант, Минский Завод Холодильников, Беларусь);
- микроцентрифуга типа «Eppendorf» с максимальной скоростью вращения не ниже 13000 об/мин;
- встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» («Bio-Vortex V-1 plus», BioSan, Латвия);
- термощейкер («Thermo Shaker TS-100» с блоком SC20N, «BioSan», Латвия);
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом;
- перчатки медицинские одноразовые;
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром (аэрозольным барьером) («FinTip», Финляндия);
- одноразовые наконечники для пипеток («FinTip», Финляндия);
- одноразовые полипропиленовые пробирки на 2 мл («SSI», кат. № 2340, США);
- магнитный штатив для выделения нуклеиновых кислот (ЗАО «Вектор Бест», кат. № E9291);

- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл («Хеликон», Россия);
- отсасыватель медицинский (В-40 «ВИСМА-ПЛАНАР»);
- контейнер с дезинфицирующим раствором («Контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», «КМ-ПРОЕКТ»), для сброса наконечников со шланга отсасывателя без помощи рук;
- открывашки для пробирок («Micro-Tube cap opener», SSI, США).

4. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

Доставка проб в лабораторию должна осуществляться в течение 3-4 часов после забора (в термосе со льдом или термоконтейнере).

Образцы сывороток или плазмы крови перед использованием необходимо отцентрифугировать при 13000 об/мин при комнатной температуре (18-25)°С в течение 5 мин.

Внимание! Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной плазмы.

4.1. Хранение биопроб.

Приготовленные биопробы могут храниться:

- при комнатной температуре до 2 часов;
- при (2-8)°С до суток;
- при температуре -20°С и ниже до 2 недель.

Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

4.2. Подготовка компонентов набора.

4.2.1. Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать анализируемые образцы и компоненты набора при комнатной температуре (18-25)°С в течение 30 мин.

4.2.2. Извлечь из набора для ПЦР серии «РеалБест» флакон с **положительным контролем** С-8895

трольным образцом (ПКО). Подготовить ПКО в соответствии с инструкцией к данному ПЦР набору.

4.2.3. Во флакон с внутренним контрольным образцом (ВКО) добавить 1 мл раствора для восстановления контрольных образцов (РВК), аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при комнатной температуре, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения хранить при (2-8)°C не более 1 мес.

4.2.4. Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к применению.

После вскрытия флакона хранить при (2-8)°C не более 1 мес.

4.2.5. Лизирующие растворы перед началом работы прогреть при (50-60)°C до растворения осадка. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом до состояния гомогенной дисперсии и во флакон с лизирующим раствором № 2 добавить 80 мкл суспензии сорбента. Тщательно перемешать.

Внимание! Лизирующий раствор № 2 после вскрытия и добавления суспензии сорбента, хранению не подлежит.

5. ВЫДЕЛЕНИЕ НК ИЗ БИОПРОБ

5.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объемом 2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли).

5.2. В каждую пробирку внести по 30 мкл раствора ВКО.

5.3. Для отрицательного контроля в пробирку (маркированную «ОКО») внести 1 мл ОКО.

5.4. Для положительного контроля в пробирку (пробирки) (маркированные «ПКО») внести 970 мкл ОКО и 30 мкл ПКО.

5.5. В остальные пробирки пипеткой с отдельным наконечником внести по 1 мл анализируемых образцов в соответствии с маркировкой пробирок.

5.6. В каждую пробирку, не задевая стенок, внести по 1 мл концентрирующего раствора.

5.7. Пробирки закрыть крышками, содержимое пробирок тщательно перемешать переворачиванием 5 раз и выдержать при комнатной температуре в течение 10-15 мин. Затем центрифугировать при 3000 об/мин при комнатной температуре в течение 5 мин*.

**Параметры центрифугирования зависят от модели используемой центрифуги:*

Eppendorf MiniSpin – 3000 об/мин

Eppendorf 5415D – 2000 об/мин

Eppendorf 5417C – 2000 об/мин

Heraeus Biofuge Pico – 2000 об/мин

5.8. Из каждой пробирки пипеткой (или *отсасывателем*) с отдельным наконечником максимально полно удалить надосадочную жидкость.

5.9. В каждую пробирку к полученному осадку добавить по **200 мкл лизирующего раствора № 1**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек, чтобы осадок отслоился от дна пробирки. Выдержать при комнатной температуре 5 мин. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирки.

5.10. В каждую пробирку (с *лизирующим раствором № 1*) добавить по **500 мкл лизирующего раствора № 2** с сорбентом. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Выдержать в термошейкере при 56°C с частотой вращения 1300 об/мин в течение 10 мин. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

5.11. В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести по **750 мкл осадителя НК**.

5.12. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Оставить при комнатной температуре (18-25)°C на 3-5 мин. Центрифугировать в течение 5 мин при 13000 об/мин.

5.13. Не взбалтывая осадок, установить

пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки пипеткой (или *отсасывателем*) с отдельным наконечником отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

5.14. В каждую пробирку к осадку добавить **500 мкл раствора для отмывки № 1**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать 5 мин при 13000 об/мин на микроцентрифуге.

5.15. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или *отсасывателем*) с отдельным наконечником, не задевая осадок.

5.16. В каждую пробирку к осадку добавить по **300 мкл раствора для отмывки № 2**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать 5 мин при 13000 об/мин на микроцентрифуге.

5.17. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или *отсасывателем*) с отдельным наконечником, не задевая осадок.

5.18. Высушить осадки в открытых пробирках при комнатной температуре (18-25)°C в течение 2-3 мин.

5.19. В каждую пробирку к осадку доба-

вить по 200 мкл элюирующего раствора. Тщательно ресуспендировать осадок на вортексе. Инкубировать в термошейкере при 56°C с частотой вращения 1300 об/мин в течение 10 мин. Центрифугировать на микроцентрифуге 1 мин при 13000 об/мин.

Пробы готовы к постановке ПЦР или ОТ-ПЦР-анализа.

Внимание! Выделенная РНК хранению не подлежит. Готовить в день проведения ОТ-ПЦР. Выделенная ДНК хранится при температуре (4-8)°C не более 24 ч.

При малом объеме исследуемой сыворотки (плазмы) набор может быть применён для выявления нуклеиновых кислот в 500 мкл образца.

В этом случае:

5.20. В пробирку внести по 30 мкл раствора ВКО.

5.21. Внести 500 мкл анализируемого образца сыворотки или плазмы крови.

5.22. Внести 500 мкл концентрирующего раствора.

Далее продолжать процедуру выделения с п. 5.6.

Внимание! При проведении количественной оценки содержания нуклеиновой кислоты возбудителя в пробе объемом 500 мкл результат (МЕ/мл или коп/мл) должен быть умножен на два.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности. Допускается транспортирование при температуре до 25°C в течение 10 суток.

Замораживание набора не допускается!

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться

в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630128, г. Новосибирск-128, а/я 102,
тел.: (383) 332-92-49, 227-60-30;
тел./факс: (383) 332-94-47, 332-94-44;
E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 334-35-90.

19.04 10

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

**Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств**

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ДИАГНОСТИКУМОВ**

**Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые половым путём
ВИЧ-инфекция
TORCH-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование**

***Стабильное качество и точный
результат для Вашей лаборатории!***

**Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52**

E-mail: vbmarket@vector-best.ru

Internet: www.vector-best.ru

Директор ООО НПФ «Литех»

Наумов А.Ю.



ВЕКТОР



**Набор реагентов
для выявления РНК
и дифференциации генотипов 1/2/3
вируса гепатита С
методом ОТ-ПЦР
в режиме реального
времени**

РеалБест РНК ВГС – 1/2/3

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Утверждена 14.10.2010

Приказом Росздравнадзора № 9845-Пр/10

НАБОР РЕАГЕНТОВ

D-0793

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест РНК ВГС-1/2/3» предназначен для выявления РНК и дифференциации генотипов 1,2,3 вируса гепатита С (ВГС) в сыворотке или плазме крови методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ–ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Набор реагентов «РеалБест РНК ВГС – 1/2/3» может быть применён в клинической практике для выявления РНК и определения генотипа вируса гепатита С.

Набор предназначен для применения с приборами «iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (НПФ «ДНК-Технология», Россия); «Rotor-Gene 3000» и «Rotor-Gene 6000» (фирма «Corbett Research», Австралия) или их аналогами.

Выделение РНК из клинического материала проводится с помощью наборов: «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» или «РеалБест экстракция 1000».

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на проведении реакции обратной транскрипции выбранного фрагмента РНК и последующей амплификации кДНК с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Анализ каждого образца проводится в отдельной пробирке, в которой содержится лиофилизованная **готовая реакционная смесь** для ОТ-ПЦР (ГРС).

Определение генотипа РНК ВГС обеспечено независимой детекцией фрагментов генома ВГС, соответствующих различным генотипам, за счёт флуорогенных генотипспецифичных зондов, детектируемых в разных каналах (см. таблицу). Для подтверждения наличия РНК ВГС в анализируемой пробе в достаточном для генотипирования количестве амплификация кДНК ВГС дополнительно регистрируется в этой же пробирке за счёт расщепления флуорогенного зонда, соответствующего любому варианту ВГС (независимо от генотипа), и регистрируемого в канале СУ5. Для контроля работы ГРС в каждой постановке применяется комплексный **положительный контрольный образец (ПКО)**, содержащий РНК ВГС генотипов 1b, 2a, 3a.

2. Состав набора:

- комплексный положительный контрольный образец (ПКО), лиофилизированный – 1 фл.;
- готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР (ГРС), лиофилизованная, для определения генотипов 1/2/3 РНК ВГС – 48 пробирок.
- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 фл., 4 мл.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность.

Набор позволяет определять генотип ВГС при концентрациях РНК не менее 400 МЕ/мл при выделении РНК из 1,0 мл пробы.

3.2. Специфичность.

Набор выявляет вирус гепатита С генотипов 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 2i, 3, 4, 5a, 6 независимо от субтипа, и определяет генотипы 1 (1a, 1b), 2 (2a, 2b, 2c, 2i), 3 (3a, 3b). В образцах, не содержащих РНК ВГС, результат анализа гарантированно (в 100% образцов) должен быть отрицательным.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2b (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с D-0793

микроорганизмами III–IV групп патогенности (*опасности*) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III–IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать **одноразовые** медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать **только одноразовые** наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности

6

D-0793

ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1–3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5–1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в реальном времени: «Rotor-Gene 3000/6000» (фирма «Corbet Research», Австралия); «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), ДТ-96 (НПФ «ДНК-Технология», Россия) или их аналог;
- ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» фирмы СП «РТС», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма «Biohit», Финляндия);

D-0793

7

- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или нитроновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «Biohit», Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный).

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Подготовить образцы для исследования и контрольные образцы (1 ОКО и 1 ПКО) с помощью наборов для выделения НК «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» или «РеалБест экстракция 1000» в соответствии с инструкцией по применению.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать ПКО, который является компонентом

набора для постановки ОТ-ПЦР и **отрицательный контрольный образец (ОКО)**, который является компонентом набора для выделения НК.

6.2. Подготовка компонентов набора.

6.2.1. Перед началом подготовки проб во флакон с ПКО добавить 1 мл РВК, плотно закрыть флакон новой пластиковой крышечкой, входящей в состав набора, аккуратно перемешать, выдержать при комнатной температуре 15 минут, после чего вновь тщательно перемешать.

ПКО после вскрытия флакона хранить в при температуре (2–8) °С течение 1 месяца.

6.2.2. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18–25) °С не менее 30 минут.

6.2.3. Вскрыть упаковку, подготовить необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в целлофановый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2–8)°С составляет 3 месяца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Пробирки с подготовленными пробами установить в магнитный штатив.

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

7.3. В каждую пробирку с ГРС пипеткой г отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной РНК.

7.4. Закрывать пробирки.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента РНК ВГС и детекции флуоресцентных сигналов. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Запрограммировать протокол проведения реакции ОТ-ПЦР:

для амплификаторов «iQ/iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ96»:

1 стадия: 45 °C – 30 минут;

2 стадия: 94 °C – 1 минута;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд,
60 °C – 20 секунд);

10

D-0793

для амплификаторов Rotor-Gene 3000/6000:

1 стадия: 45 °C – 30 минут;

2 стадия: 94 °C – 1 минута;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд,
60 °C – 40 секунд).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.8. Для всех образцов задать измерение флуоресценции по 4 каналам в соответствии с таблицей в зависимости от используемого амплификатора.

Таблица

	«iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ96»	«Rotor-Gene 3000/6000»
генотип 1	HEX	JOE (Yellow)
генотип 2	FAM	FAM (Green)
генотип 3	ROX	ROX (Orange)
Все генотипы	Cy5	Cy5 (Red)

7.9. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительными и отрицательным контролем согласно инструкции к используемому амплификатору.

7.10. Запустить программу и провести ОТ-ПЦР с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

D-0793

11

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При применении набора с амплификаторами «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и программой «РеалБест диагностика», программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

При использовании других амплификаторов учёт результатов выполняется в соответствии с **разделом 9** данной инструкции и **Приложениями 1 и 2**.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Общие условия анализа и учёта результатов.

9.1.1. В ПКО программа должна фиксировать нарастание специфического сигнала амплификации **кДНК ВГС** во всех каналах: «HEX» (*генотип 1*), «FAM» (*генотип 2*), «ROX» (*генотип 3*), «Cy5» (*все генотипы ВГС*) и определять значение порогового цикла **Ct ВГС**.

9.1.2. Результаты индивидуальной постановки ПЦР подлежат анализу и учёту, если для ПКО значение **Ct** в каналах «FAM», «HEX», «ROX» и «Cy5» не превышает значений, указанных во вкладыше в наборы данной серии.

9.1.3. В ОКО программа не должна фиксировать нарастания специфического сигнала

амплификации **кДНК ВГС** в каналах «FAM», «HEX», «ROX» и «Cy5».

9.1.4. Если для ОКО значение **Ct** в любом из каналов «FAM», «ROX», «HEX» или «Cy5» **меньше или равно 40**, то это свидетельствует о **наличии контаминации**. В этом случае все положительные результаты данной индивидуальной постановки ОТ-ПЦР по этому каналу следует считать **недостоверными**. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получены значения **Ct менее 40** по соответствующему каналу. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как **отрицательные**.

9.2. Определение генотипа ВГС.

9.2.1. Анализируемый образец содержит **ВГС генотипа 1**, если значения **Ct** в каналах «HEX» и «Cy5» **меньше или равны 40**.

9.2.2. Анализируемый образец содержит **ВГС генотипа 2**, если значения **Ct** в каналах «FAM» и «Cy5» **меньше или равны 40**.

9.2.3. Анализируемый образец содержит **ВГС генотипа 3**, если значения **Ct** в каналах «ROX» и «Cy5» **меньше или равны 40**.

9.2.4. Анализируемый образец содержит РНК ВГС генотипа, отличного от 1 (1a, 1b), 2 (2a, 2b, 2c, 2i), 3 (3a, 3b), если получен положительный результат амплификации в канале «Сu5» и не регистрируется значение **St** **менее или равное 40** в каком-либо из каналов: «FAM», «ROX» или «HEX».

Внимание! Если в анализируемом образце определяется два или три генотипа ВГС одновременно, **следует связаться со специалистом ЗАО «Вектор-Бест» (тел.: (383) 334-35-90)** для детального анализа результатов. Такой образец **следует заморозить (не утилизировать!)**, чтобы, в случае необходимости, провести дополнительное исследование.

9.2.5. Если концентрация РНК ВГС в анализируемом образце менее 400 МЕ/мл, чувствительность набора может оказаться недостаточной для установления генотипа ВГС. Концентрацию РНК в образце можно определить с помощью наборов реагентов «РеалБест РНК ВГС» и «РеалБест ВГС ПЦР».

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание наборов не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности. Замораживание наборов не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58;
тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52;
E-mail: vbobtk@vector-best.ru.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ:

- Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом;
- При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов следует проводить по МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»;
- Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007;

- Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности;
- Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.
- Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации;
- Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности;
- Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.
- Производитель обязуется за свой счёт заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) * которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Проведение анализа на приборе «ДТ-96» (НПО «ДНК-Технология»)

1. Настройка экспозиции измерений.

В режиме «Работа с прибором» в меню «Настройки» выберите пункт «Экспозиция измерений».

В открывшемся окне выберите канал «FAM», измените значение экспозиции на «250», для каналов «HEX» и «ROX» установите значение экспозиции «1000». Подтвердите сохранение текущего значения экспозиции, нажав «ДА».

Внимание! Указанные значения экспозиций применимы только для наборов «РеалБест» и при необходимости должны быть изменены на исходные.

2. Программирование амплификатора.

2.1. Для создания протокола амплификации нажать кнопку «Создать» во вкладке «Запуск программы амплификации».

2.2. В открывшемся окне выбрать первый шаблон программы амплификации, отредактировать его в соответствии с программой амплификации к используемому набору:

Для наборов «РеалБест ДНК»:

- 1 стадия: 50 °C – 2 минуты;
- 2 стадия: 95 °C – 2 минуты;
- 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд,
60 °C – 20 секунд);

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

Для наборов «РеалБест РНК»:

- 1 стадия: 45 °C – 30 минут;
- 2 стадия: 94 °C – 1 минута;
- 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд,
60 °C – 20 секунд);

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

2.3. В ячейке «Имя программы» ввести название созданного протокола амплификации (например, PCR и RT-PCR) и нажать «ОК». В открывшемся окне указать папку для сохранения файла и нажать «сохранить».

2.4. В ячейке «Объём рабочей смеси» указать значение «50».

2.5. Во вкладке «Протокол» сначала ввести названия всех образцов, участвующих в постановке, затем заполнить планшет.

Для упрощения заполнения планшета можно создать заготовку, для этого в меню «Тест» выбрать «Создать/редактировать тест», затем «Копировать текущий тест» с именем TEST и присвоить имя новому тесту.

В открывшемся окне в пункте «1.Анализ» выставить тип анализа (*количественный или качественный со стандартами в соответствии с набором*) и метод «Геометрический (Ср)».

Для качественного анализа в пункте «4.Контроли» выставить «1»; для количественного анализа со стандартами (*при постановке с КО1, КО2*) в пункте «3.Стандарты» в ячейке «Количество» выставить «2», в ячейке «2.Дубли» – «3», в пункте «4.Контроли» в ячейке «К⁺» выставить «3», в ячейке «К⁻» – «1».

Если постановка без КО1 и КО2, то в пункте «3.Стандарты» в ячейке «Количество» поставить «0».

В пункте «5.Объем рабочей смеси в пробирке» выставить значение «50».

В пункте «6. Флуорофоры» обозначить внутренний контроль (ВК) по каналу «FAM» и специфику по каналу «HEX» или «ROX» в соответствии с инструкцией к набору.

По завершении редактирования нажать «ОК».

В дальнейшем при заполнении протокола следует использовать кнопку «Добавить тест», из списка выбрать нужный для данной постановки и ввести число образцов и контролей.

По окончании заполнения протокола нажать «Применить».

2.6. Программа перейдет на вкладку «Запуск программы амплификации», запустить амплификацию кнопкой «Запуск программы». Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «Запуск программы» в файл с расширением *.r96.

3. Анализ и учёт результатов.

Детекция флуоресценции осуществляется по каналам «FAM» и «ROX» для ДНК ВКО и ДНК возбудителя, соответственно.

Программа автоматически высчитывает пороговое значение флуоресценции по методу Геометрический (Ср).

При одновременном выявлении ДНК двух возбудителей ДНК второго возбудителя детектируется по каналу «HEX».

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Действия при использовании амплификаторов «Rotor-Gene 3000/6000/Q».

1) Нажать кнопку «New» в основном меню программы.

2) В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента «Advanced». Нажать кнопку «New».

3) Выбрать ротор на 36 лунок «36-Well Rotor», и отметить, что используются пробирки с плоскими крышками. Нажать кнопку «Next».

4) В открывшемся окне выбрать объем реакционной смеси 50 мкл. Нажать кнопку «Next».

5) В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку «Edit Profile» и задать следующие параметры:

1. Hold 45 °C – 30 минут;
2. Hold 94 °C – 1 минута;
3. Cycling 94 °C – 10 секунд;
60 °C* – 40 секунд;
- Cycle repeats – 50 times.

**Измерение флуоресценции проводить при 60 °C по каналам «JOE», «FAM», «ROX» и «Cy5».*

6) После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку «OK».

7) В окне «New Run Wizard» нажать кнопку «Gain Optimisation» В открывшемся окне в строке «Channel Settings» выбрать каналы «JOE», «FAM», «ROX» и «Cy5». Установить «Tube Position» 1. Отметить галочкой «Perform Calibration Before 1st Acquisition». Нажать кнопку «Close».

8) Нажать кнопку «Next», запустить амплификацию кнопкой «Start run».

9) Сохранить файл в папке Rotor-Gene/templates под названием «РеалБест» с расширением *.ret. Тогда при дальнейшей работе программа «РеалБест» будет представлена в списке «New» в основном меню программы. Заново создавать температурный протокол или протокол калибровки не потребуется.

10) Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «Start run» в файл с расширением *.rex.

11) Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

12) Запустить программу и провести ОТ-ПЦР с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

Детекция флуоресценции осуществляется по каналам «JOE», «FAM», «ROX» и «Cy5».

Анализ результатов амплификации кЛНК ВГС:

Нажать в меню кнопку «Analysis», выбрать режим анализа «Quantitation», нажать кнопку «Cycling A. Cy5», «Show».

Отменить автоматический выбор Threshold, нажав кнопку «OK» в появившемся окне.

Нажать клавишу «Linear scale».

В меню основного окна «Quantitation analysis» должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» и «Slope Correct».

Нажать кнопку «More Settings», установить значение NTC threshold 10%.

В области «CT Calculation» (в правой части окна) выставить в окне «Threshold» значение 0,04.

В таблице результатов – окно «Quant. Results» появятся значения Ct.

Анализ результатов амплификации кЛНК ВГС генотип 1:

Нажать в меню кнопку «Analysis», выбрать режим анализа «Quantitation», нажать кнопку «Cycling A. JOE», «Show».

Отменить автоматический выбор Threshold, нажав кнопку «OK» в появившемся окне.

Нажать клавишу «Linear scale».

В меню основного окна «Quantitation analysis» должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» и «Slope Correct».

Нажать кнопку «More Settings», установить значение NTC threshold 10%.

В области «CT Calculation» (в правой части окна) выставить в окне «Threshold» значение 0,04.

В таблице результатов (окно «Quant. Results») появятся значения Ct.

Анализ результатов амплификации кЛНК ВГС генотип 2:

Нажать в меню кнопку «Analysis», выбрать режим анализа «Quantitation», нажать кнопку «Cycling A. FAM», «Show».

Отменить автоматический выбор Threshold, нажав кнопку «OK» в появившемся окне.

Нажать клавишу «Linear scale».

В меню основного окна «Quantitation analysis» должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» и «Slope Correct».

Нажать кнопку «More Settings», установить значение NTC threshold 10%.

В области «CT Calculation» (в правой части окна) выставить в окне «Threshold» значение 0,04.

В таблице результатов – окно «Quant. Results» появятся значения Ct.

Анализ результатов амплификации
кДНК ВГС генотип 3:

Нажать в меню кнопку «Analysis», выбрать режим анализа «Quantitation», нажать кнопку «Cycling A. ROX», «Show».

Отменить автоматический выбор Threshold, нажав кнопку «OK» в появившемся окне.

Нажать клавишу «Linear scale».

В меню основного окна «Quantitation analysis» должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» и «Slope Correct».

Нажать кнопку «More Settings», установить значение NTC threshold 10%.

В области «CT Calculation» (в правой части окна) выставить в окне «Threshold» значение 0,04.

В таблице результатов – окно «Quant. Results» появятся значения Ct.

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения п количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Обратитесь к Инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 334-35-90.

25.03.16

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

**Международные сертификаты
ISO 9001 и ISO 13485**

**НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПЦР
С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ
РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

**Вирусные гепатиты В и С,
ВИЧ-инфекция, ИППП,
герпесвирусные инфекции,
токсоплазмоз, краснуха,
клещевые инфекции,
желудочно-кишечные
заболевания,
наборы для выделения НК**

Всегда точно – всегда **ВОВРЕМЯ!**

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492

**Тел.: (383) 332-37-58, 332-37-10, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52**

Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)

E-mail: vbmarket@vector-best.ru

Internet: www.vector-best.ru

Копия на 15 листах верна.

Директор ООО НПФ «Литех»

Наумов А.Ю.

