



УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НПО «Литех»

А.Ю.Наумов

«15» января 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики in vitro
Набор реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса гепатита С
методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией
ПОЛИВИР HCV Количественный

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **ПОЛИВИР HCV Количественный** предназначен для одновременного выявления и количественного определения РНК вируса гепатита С (*Hepatitis C Virus, HCV*) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в пробах нуклеиновых кислот (НК), выделенных из клинических образцов (плазма и сыворотка крови).

Функциональное назначение – Набор реагентов **ПОЛИВИР HCV Количественный** предназначен для диагностики вирусного гепатита С и определения вирусной нагрузки.

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 **ПОЛИВИР HCV 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.

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

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор **ПОЛИВИР HCV Количественный** выпускается в 1 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	1 пробирка - 1100 мкл
2. Разбавитель	1 пробирка - 1,8 мл
3. Смесь ферментов	1 пробирка - 550 мкл
4. ВКО	1 пробирка - лиофилизат
5. Стандартный контрольный образец 1	1 пробирка - лиофилизат
6. Стандартный контрольный образец 2	1 пробирка - лиофилизат
7. Раствор для восстановления	1 пробирка - 1,8 мл

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:

- 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.

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 *НСV* 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;
- памятка по применению набора;
- вкладыш с данными стандартных контрольных образцов.

Паспорт (при необходимости, ГОСТ 51088) 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 НCV 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 (5th WHO International Standard for HCV RNA for NAT, 14/150 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*, *HSV 1 и 2 типа*, *CMV*, *EBV*, *VZV*, *HHV6*, *TBE Virus*, *Adenovirus 2, 3 и 7 типов*, *Parvovirus B19*, *вируса гриппа типов A и B*, *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.

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 Количественный** можно обнаружить 100 и более МЕ/мл вируса гепатита С, присутствующего в прошедшей обработку (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 S_t 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.

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

6.1. Диагностическая 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 диагностических характеристик набора **ПОЛИВИР HCV Количественный** на разных видах клинических образцов (сыворотка и плазма крови).

Таблица 2.

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 *HCV*, полученных с помощью наборов реагентов «АмплиПрайм® HCV-Монитор-Fl», «РеалБест РНК ВГС количественный» и ПОЛИВИР HCV Количественный.

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

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

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 ПОЛИВИР HCV Количественный составляет 100% и подтверждена в ходе проведения клинических испытаний на заявленных термоциклах и разных сериях набора (внутрисерийная, межсерийная и внутримышечная воспроизводимость). Коэффициент вариации измерения концентрации для одного и того же образца не превышает 10%.

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 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 сенсibilизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

8. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

- набор реагентов для проведения ОТ-ПЦР;
- ПЦР-боксы 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 НСВ 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 +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 НСВ Количественный** для полного цикла исследования образцов.

Для выделения РНК необходимо при экстракции вместе с исследуемым образцом внести **5 мкл восстановленного ВКО** из набора реагентов **ПОЛИВИР НСВ 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 **ПОЛИВИР НСВ Количественный** являются образцы РНК, выделенные из клинических проб. Анализ рисков показал, что возможными ошибками применения набора реагентов **ПОЛИВИР НСВ 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» (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.

Таблица 3.

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 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 +2...+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 -18...-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):

Таблица 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. Перемешать 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 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)	

«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)	

«iCycler IQ5» (BioRad)

+42°C	40 мин	
+93°C	2 мин	
+93°C	20 сек	5 циклов
+64°C	40 сек	
+93°C	20 сек	40 циклов
+64°C	40 сек (считывание по каналам FAM, HEX)	

«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)*	

*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).

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 ПОЛИВИР HCV Количественный, представлены в таблице 5 на примере амплификатора с детекцией в режиме «реального времени» ДТprime (ДНК-технология, Россия).

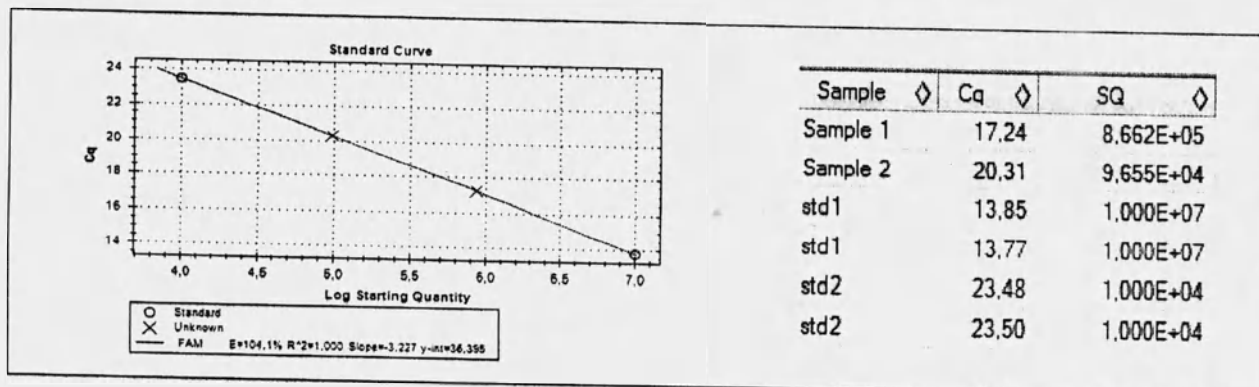
Таблица 5.

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) 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 (рис.1).

Рисунок 1. Пример представления результата количественного анализа программным обеспечением CFX96.



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

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), КЦ – 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.

Закключение 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.
менее 5×10^2 МЕ/мл, но более 100 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 предварительно 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:

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

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

$$\text{Фактическая концентрация РНК HCV} = \frac{\text{Рассчитанная концентрация РНК HCV}}{X}$$

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.

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Условия хранения

Набор **ПОЛИВИР НCV Количественный** должен храниться при температуре $-18...-20^{\circ}\text{C}$ 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 НCV Количественный** 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 $+2...+8^{\circ}\text{C}$ 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 клинично-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 НCV Количественный**, 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 12 ЛИСТОВ

15 СЕНТЯБРЯ 2011 год

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



Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов
12 шт.

Директор
Наумов А.Ю.



Заключение по результатам выявления и количественной оценки содержания РНК HCV в анализируемых образцах с помощью программного обеспечения прибора проводится согласно таблице ниже. 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.

Рассчитанная концентрация РНК HCV по каналу FAM/Green	Значение Ct по каналу HEX/Yellow	Заключение
любая	H3 или > КЦ	РНК HCV ОБНАРУЖЕНА. Однако образец не пригоден для количественного анализа. ТРЕБУЕТСЯ повторить анализ образца с этапа пробоподготовки.
в диапазоне линейности, от 5x10 ² до 1x10 ⁸ МЕ/мл	< КЦ	РНК HCV ОБНАРУЖЕНА, указывается рассчитанная концентрация МЕ/мл.
менее 5x10 ² МЕ/мл, но более 100 МЕ/мл	< КЦ	РНК HCV ОБНАРУЖЕНА, концентрация менее 5x10 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 1x10 ⁸ МЕ/мл	< КЦ	РНК HCV ОБНАРУЖЕНА, концентрация более 1x10 ⁸ МЕ/мл. Для определения точной концентрации РНК HCV в клиническом образце, рекомендуется повторить анализ образца с этапа пробоподготовки. Для анализа необходимо предварительно 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	H3 или > КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение РНК. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

Примечание: H3 – нет значения (значение N/A или H3), 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:

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

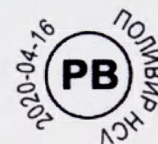
И далее определить фактическую концентрацию РНК HCV в клиническом образце по формуле:

$$\text{Фактическая концентрация РНК HCV} = \frac{\text{Рассчитанная концентрация РНК HCV}}{X}$$

Точное указание фактической концентрации РНК HCV возможно только для случаев рассчитанной концентрации РНК HCV, определенной в диапазоне линейности от 5x10² до 1x10⁸ МЕ/мл.

С помощью набора ПОЛИВИР HCV Количественный можно обнаружить 100 и более МЕ/мл вируса гепатита С, присутствующего в прошедшей обработку (выделение РНК) пробе;

По всем вопросам обращайтесь в офис компании ООО НПФ «Литех»: многоканальный телефон (495) 258-39-47, e-mail: info@lytech.ru, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, дом 1, строение 3



ПАМЯТКА

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса гепатита С методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

ПОЛИВИР HCV Количественный

Набор реагентов ПОЛИВИР HCV Количественный предназначен для одновременного выявления и количественного определения РНК вируса гепатита С (Hepatitis C Virus, HCV) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в пробах нуклеиновых кислот (НК), выделенных из клинических образцов (плазма и сыворотка крови).

1. Подготовка компонентов к проведению анализа.

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

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

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

Приготовленный таким образом ВКО использовать в процедуре экстракции РНК.

Восстановленный ВКО хранить при температуре +2...+8 °C в течение 12 месяцев.

Не замораживать!

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 вортке.

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

2. 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.

2.1. 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).

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

2.3. 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.

2.4. Перемешать амплификационную смесь пипетированием или импульсным ворткесированием в течение 10 секунд.

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

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.

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

3. Проведение амплификации.

3.1. 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 и HEX/Yellow.

«CFX 96» (BioRad)			«iCycler IQ5» (BioRad)		
+42°C	40 мин	5 циклов	+42°C	40 мин	5 циклов
+95°C	2 мин		+93°C	2 мин	
+95°C	20 сек		+93°C	20 сек	
+64°C	40 сек		+64°C	40 сек	
+95°C	20 сек		+93°C	20 сек	
+64°C	40 сек (считывание)*	40 циклов	+64°C	40 сек (считывание)*	40 циклов
«Rotor-Gene Q» (Qiagen)			«DTprime» (ДНК-Технология)		
+37°C	40 мин	5 циклов	+42°C	40 мин	5 циклов
+95°C	5 мин		+93°C	2 мин	
+95°C	20 сек		+93°C	20 сек	
+60°C	40 сек		+60°C	40 сек	
+95°C	20 сек		+93°C	20 сек	
+60°C	40 сек (считывание)**	40 циклов	+60°C	40 сек (считывание)*	40 циклов

*Детекция кДНК HCV осуществляется по каналу FAM, детекция ВКО – по каналу HEX.

**Оптимизация всех красителей перед первым считыванием! Детекция кДНК HCV осуществляется по каналу Green, детекция ВКО – по каналу Yellow.

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).

4. Анализ результата.

После завершения программы амплификации применить следующие настройки:

Амплификатор	Параметр	Канал флуоресценции	
		FAM/Green (HCV)	HEX/Yellow (ВКО)
IQ5 (BioRad)	Baseline cycles c 5 to 10		
	Baseline threshold	100	
	Конечный цикл (КЦ)	35	25
CFX96 (BioRad)	Analyze Data from Cycle 5 to 40 Baseline Setting – Apply Fluorescence Drift Correction		
	Baseline threshold	100	
	Конечный цикл (КЦ)	35	25

Rotor-Gene Q (Qiagen)	Dynamic Tube on, Slope correct on Outer removal 10%, Cycles before 0		
	Baseline threshold	0,02	0,03
	Конечный цикл (КЦ)	35	25
DTprime (ДНК-Технология)	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) 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.

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

5. Интерпретация результата.

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

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), КЦ – 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.