

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

Образец	Значения Ct		Результат
	Канал FAM/Green (HCV)	Канал HEX/Yellow (ВКО)	
ПКО	соответствуют вкладышу		Реакция прошла
	не соответствуют вкладышу		Реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
ОКО-ПЦР	НЗ	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	< 40	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки после принятия антиконтаминационных мер.
ОКО-выделения	НЗ	< КЦ	Специфическая контаминация отсутствует.
	< 40	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа с этапа пробоподготовки.
	НЗ	НЗ или > КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение РНК. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.
Исследуемый образец	< КЦ	любой	ПРИСУТСТВИЕ РНК вируса гепатита С.
	НЗ	< КЦ	ОТСУТСТВИЕ РНК вируса гепатита С.
	> КЦ	< КЦ	Сомнительный результат. Следует повторить анализ с этапа пробоподготовки. При воспроизведении результата образец считается положительным.
	НЗ	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.

С помощью набора ПОЛИВИР HCV Качественный 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 РНК вируса гепатита С методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией **ПОЛИВИР HCV Качественный**.

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

1. Подготовка компонентов к проведению анализа.

Перед первым использованием набора необходимо восстановить образцы ВКО и ПКО!

1.1 Пробирки с лиофилизированными образцами ВКО (внутренним контрольным образцом) и ПКО (положительным контрольным образцом) кратко центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе 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 вортексе.

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 пробирку с ПКО 400 мкл Раствора для восстановления. Растворять образец не менее 10 минут, периодически перемешивая на вортексе.

Восстановленный ПКО 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 вортиксованием 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:

- 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.

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)

+42°C	40 мин	
+95°C	2 мин	
+95°C	20 сек	5
+64°C	40 сек	циклов
+95°C	20 сек	40
+64°C	40 сек (считывание)*	циклов

«iCycler IQ5» (BioRad)

+42°C	40 мин	
+93°C	2 мин	
+93°C	20 сек	5
+64°C	40 сек	циклов
+93°C	20 сек	40
+64°C	40 сек (считывание)*	циклов

«Rotor-Gene Q» (Qiagen)

+37°C	40 мин	
+95°C	5 мин	
+95°C	20 сек	5
+60°C	40 сек	циклов
+95°C	20 сек	40
+60°C	40 сек (считывание)**	циклов

«ДТprime» (ДНК-Технология)

+42°C	40 мин	
+93°C	2 мин	
+93°C	20 сек	5
+60°C	40 сек	циклов
+93°C	20 сек	40
+60°C	40 сек (считывание)*	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 и интерпретация результата.

После завершения программы амплификации применить следующие настройки:

Амплификатор	Параметр	Канал флуоресценции	
		FAM/Green (HCV)	HEX/Yellow (ВКО)
IQ5 (BioRad)	Baseline cycles с 5 по 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
ДТprime (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.



УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НИИФ «Литех»

А.Ю.Наумов

2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

Функциональное назначение – Набор реагентов **ПОЛИВИР HCV Качественный** предназначен для диагностики вирусного гепатита С.

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 Качественный** 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 клинико-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ДНК-диагностики.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор **ПОЛИВИР HCV Качественный** выпускается в 1 варианте исполнения (табл. 1).

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. ПКО	1 пробирка - лиофилизат
6. Раствор для восстановления	1 пробирка - 1,8 мл

В состав набора входят готовые к применению реагенты.

В состав реакционной смеси входят:

- раствор дНТФ;

- ОТ-ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды: зонд для специфического фрагмента генома вируса гепатита С содержит флуорофор FAM, зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX.
- праймеры для выявления кДНК вируса гепатита С;
- праймеры для выявления внутреннего контроля; внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации (ОТ-ПЦР), а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения РНК.

В состав Смеси ферментов входят:

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

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

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

ПКО (положительный контрольный образец) представляет собой смесь кДНК-мишени генома вируса гепатита С и внутреннего контроля.

4.2. Комплектность

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- памятка по применению набора;
- вкладыш с данными ПКО.

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 HCV Качественный** 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).

4.4. 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 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.

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 Качественный** можно обнаружить 100 и более МЕ/мл вируса гепатита С, присутствующего в прошедшей обработку (выделение РНК) пробе.

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 Качественный** 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. Воспроизводимость результатов исследования с использованием набора **ПОЛИВИР HCV Качественный** составляет 100% и подтверждена в ходе проведения клинических испытаний на заявленных термоциклерах и разных сериях набора (внутрисерийная, межсерийная и внутривыпускная воспроизводимость). Коэффициент вариации измерения *St* 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 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 Качественный** 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 HCV Качественный для полного цикла исследования образцов.

Для выделения РНК необходимо при экстракции вместе с исследуемым образцом внести **5 мкл восстановленного ВКО** из набора реагентов **ПОЛИВИР HCV Качественный**. 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 Качественный** являются образцы РНК, выделенные из клинических проб. Анализ рисков показал, что возможными ошибками применения набора реагентов **ПОЛИВИР HCV Качественный** 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 Качественный** 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 образцы ВКО и ПКО!

10.1.1 Пробирки с лиофилизированными образцами ВКО (внутренним контрольным образцом) и ПКО (положительным контрольным образцом) кратко центрифугировать на микроцентрифуге-вортке 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 вортке.

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 пробирку с ПКО 400 мкл Раствора для восстановления. Растворять образец не менее 10 минут, периодически перемешивая на вортке.

Восстановленный ПКО 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 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.

10.2.2. 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 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.

10.2.7. 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	
+64°C	40 сек (считывание по каналам FAM, HEX)	40 циклов

«ДТprime» (ДНК-Технология)

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

«iCycler IQ5» (BioRad)

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

«Rotor-Gene Q» (Qiagen)

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

*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.

Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов **ПОЛИВИР НСВ Качественный**, 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.

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

11.2. Интерпретация результатов

Интерпретация результатов анализа с целью выявления РНК *HCV* проводится в соответствии с таблицей 6. Для положительных образцов важно убедиться, что кривая накопления флуоресцентного сигнала имеет характерную S-образную форму, в противном случае образец считается отрицательным.

Таблица 6.

Образец	Значения Ct		Результат
	Канал FAM/Green (HCV)	Канал HEX/Yellow (ВКО)	
ПКО	соответствуют вкладышу		Реакция прошла
	не соответствуют вкладышу		Реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
ОКО-ПЦР	НЗ	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	< 40	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки после принятия антиконтаминационных мер.
ОКО-выделения	НЗ	< КЦ	Специфическая контаминация отсутствует.
	< 40	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа с этапа пробоподготовки.
	НЗ	НЗ или > КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение РНК. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.
Исследуемый образец	< КЦ	любой	ПРИСУТСТВИЕ РНК вируса гепатита С.
	НЗ	< КЦ	ОТСУТСТВИЕ РНК вируса гепатита С.
	> КЦ	< КЦ	Сомнительный результат. Следует повторить анализ с этапа пробоподготовки. При воспроизведении результата образец считается положительным.
	НЗ	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.

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Условия хранения

Набор **ПОЛИВИР HCV Качественный** 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 Качественный** 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 контроля качества лабораторных исследований по обнаружению РНК выявляемых микроорганизмов (например, панели ФСВОК, международные стандарты).

14. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

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 клиничко-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, образцы материала после пробоподготовки (выделение ДНК) и отходы после проведения амплификации относятся к классу Б (эпидемически опасные отходы).

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

15. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора **ПОЛИВИР HCV Качественный**, 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 10 ЛИСТОВ

« 14 » 03 2021 год

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



Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов
шт.

Директор
Наумов А.Ю.

