



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А.Н. Тороповский
«26» августа 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

Набор реагентов для одновременного качественного выявления НК вирусов гепатитов В, С, D методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-VCD-тест»

ТУ 21.20.23-021-97638376-2020

Содержание

Введение.....	3
1. Назначение.....	6
2. Принцип метода	6
3. Состав набора реагентов	9
4. Характеристики набора реагентов	11
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов.....	19
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	19
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	21
8. Анализируемые образцы	23
9. Подготовка компонентов набора для исследования.....	27
10. Проведение анализа	28
11. Регистрация и интерпретация результатов.....	31
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов	34
13. Утилизация	35
14. Гарантийные обязательства, контакты	36
Приложение А	37

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ОТ	обратная транскрипция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	комплементарная ДНК
РНК	рибонуклеиновая кислота
HBV	вирус гепатита В
HCV	вирус гепатита С
HDV	вирус гепатита D
ВКО	внутренний контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
КО-1	калибровочный образец № 1
КО-2	калибровочный образец № 2
КОЧ	контрольный образец для определения чувствительности
КОС	контрольный образец специфичности

Введение

Инфекция вирусами гепатитов В и С – основная причина заболеваний печени. Вирус гепатита В (HBV), РНК вирусов гепатитов С (HCV) и D (hepatitis delta, HDV). Несмотря на меньшую распространённость, при коинфекции и суперинфекции с гепатитом В значительно осложняет течение заболевания. Тестирование и своевременная диагностика гепатитов определяют показания к адекватной терапии и позволяют проводить мониторинг противовирусной терапии.

Целевой анализ: специфичные участки геномной ДНК вируса гепатита В (hepatitis B, HBV), РНК вирусов гепатитов С (hepatitis C, HCV) и D (hepatitis delta, HDV).

Научная обоснованность целевого анализа заключается в его специфичности (уникальности последовательности ДНК или РНК) в отношении геномов вирусов гепатита В, С и D.

Вирус гепатита В – представитель семейства гепаднавирусов (Hepadnaviridae). Геном представлен кольцевой молекулой ДНК.

Вирус гепатита С – представитель семейства флавивирусов (Flaviviridae). Геном представлен одноцепочечной линейно молекулой РНК. Важной особенностью генома является высокая гетерогенность. К настоящему времени выделяют 8 типов.

Вирус гепатита D – представитель рода *Deltavirus* (семейство не определено). Геном представлен кольцевой одноцепочечной молекулой РНК длиной около 1700 нуклеотидов. Для репликации вируса требуется присутствие вируса гепатита В.

Инфицирование вирусом гепатита В (HBV) и С (HCV) остается глобальной проблемой здравоохранения. В Российской Федерации частота инфицирования вирусом гепатита В колеблется от 1,85 до 128,69 на 100 тыс. населения в разных субъектах РФ. В 2018 году в России выявлено 61,9 тысяч случаев инфицирования вирусом гепатита С. Это наглядно иллюстрирует актуальность диагностики вирусов гепатита. Вирус гепатита D, несмотря на меньшую распространённость, при коинфекции или суперинфекции с гепатитом В значительно осложняет течение заболевания.

Область применения набора реагентов: клиническая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: при подозрении на инфицирование вирусными гепатитами В, С и D.

Противопоказания к применению: при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению.

Популяционные, демографические аспекты применения набора реагентов «HEPA-BCD-тест» не выявлены.

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: Набор реагентов «HEPA-BCD-те» предназначен для качественного выявления и дифференциальной диагностики вируса гепатита В, вируса гепатита С и D методом одностадийной обратной транскрипции – мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в пробе нуклеиновых кислот, выделенной из плазмы крови К2-ЭДТА человека, у пациентов с подозрением на инфицирование вирусными гепатитами В, С и D.

Функциональное назначение: полученные результаты могут использоваться для диагностики заболеваний, вызванных вирусом гепатита В, С и D.

Потенциальные потребители медицинского изделия

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиническо-лабораториях. Профессиональный уровень пользователей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник, лабораторный технолог.

2. Принцип метода

Метод

Одностадийная обратная транскрипция – мультиплексная аллель-специфическая полимеразная цепная реакция с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат нуклеиновые кислоты, выделенные из плазмы крови К2-ЭДТА человека.

Принцип определения

Качественное выявление специфических участков генома вируса гепатита В и РНК вирусов гепатита С и D методом одностадийной обратной транскрипции – мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в пробе нуклеиновой кислоты (далее – НК), выделенной из клинического материала, включает в себя три этапа:

1. Подготовка ОТ-ПЦР;

2. Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени;

3. Интерпретация результатов.

С пробами НК проводится реакция одностадийной обратной транскрипции – мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции специфических участков генома вирусов гепатитов при помощи праймеров в реакционном буфере. При наличии в пробе вирусов гепатита С и D их РНК ревертируется

в ходе обратной транскрипции с образованием кДНК; при наличии в пробе вируса гепатита В его ДНК проходит стадию обратной транскрипции без изменений. По завершению обратной транскрипции осуществляется «горячий старт», в результате инактивируется ревертаза и активизируется полимераз, запускается стадия ПЦР-амплификации ДНК и кДНК.

В состав ОТ-ПЦР-буфера входят все основные реагенты, включая ревертазу с «тёплым стартом», термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты и оптимизированный буфер.

В составе смесей олигонуклеотидов присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и гидролизуются (разрушаются) *Taq*-полимеразой, в результате чего разобщаются краситель и тушитель, и происходит нарастание интенсивности флуоресценции по соответствующему диапазону оптического спектра. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путём измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

Набор содержит реагенты для мультиплексного определения специфических участков (мишеней) геномной ДНК вируса гепатита В и РНК вирусов гепатитов С и D, а также внутреннего контрольного образца (ВКО) (табл. 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору			
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
ДНК вируса гепатита В	ВКО	РНК вируса гепатита С	РНК вируса гепатита D

ВКО позволяет оценить качество и эффективность выделения НК и возможного наличия ингибиторов обратной транскрипции амплификации в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

Ограничения метода

Возможная причина получения ложноположительных и отрицательных результатов – контаминация на этапе выделения НК или проведения реакции мультиплексной ОТ-ПЦР/ПЦР. Ложноположительный результат может быть выявлен с помощью отрицательного контрольного образца.

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

Использование набора с истекшим сроком годности и нарушение условий хранения набора.

Нарушение условий хранения при транспортировании образцов.

Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах исследования с использованием данного МВ в диагностических целях результаты должны использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования другими тест-системами (например, серологическими тестами, предназначенными для обнаружения антител или антигенов с помощью иммуноферментного или иммунохемилюминесцентного анализа, применяемой терапией).

При очень низкой вирусной нагрузке (менее 250 копий/мл), которая может быть обусловлена применяемой противовирусной терапией или особенностями течения заболевания, возможно получение ложноотрицательных результатов. В этих случаях

рекомендовано использование большего объема клинического материала для выделения НК для понижения порога чувствительности тест-системы.

Время проведения ОТ-ПЦР составляет от 120 до 145 минут без учета пробоподготовки), в зависимости от используемого амплификатора.

3. Состав набора реагентов

Набор реагентов «HEPA-BCD-тест» выпускается в одной форме комплекта- «HEPA-BCD-тест».

Количество анализируемых проб

Набор реагентов рассчитан на 96 реакций, что соответствует определению 94 исследуемых образцов, отрицательных и положительных образцов при единичном запуске амплификатора на 96 лунок или 32 единичным постановкам исследуемых образцов с

каждой постановке. Положительными и отрицательными контрольными образцами в

Таблица 2 – Состав набора реагентов «HEPA-BCD-тест»

№ п/п	Название реагента	Описание	Количество, объем
1.	ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2.	Смесь олигонуклеотидов	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 1 440 мкл
3.	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 160 мкл
4.	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1 600 мкл
5.	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 950 мкл

Примечание: Эксплуатационная документация (инструкция по применению и паспорт качества) не входит в состав изделия, но входит в комплект поставки изделия. Набор реагентов, для обеспечения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер из пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается

инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставленную партию изделия.

Состав набора

В состав ОТ-ПЦР-буфера входят все основные реагенты, включая ревертазу с «тёплым стартом», термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты и оптимизированный буфер.

Смесь олигонуклеотидов готова к использованию и содержит праймеры и зонды, предназначенные для выявления специфических мишеней – см. таблицу 1. Смесь олигонуклеотидов находится в 1 мл водном растворе ТЕ (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА), свободном от нуклеаз.

ПКО готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов геномной ДНК вируса гепатита В и кДНК вируса гепатита С и D, а также фрагмента генома бактериофага. ПКО находится в 10% ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА).

ОКО готов к использованию и представляет собой деионизованную воду, свободную от ДНКаз и РНКаз.

ВКО представляет собой плазмидную ДНК с синтетической вставкой амплифицируемого фрагмента ДНК генома бактериофага. ВКО находится в 10% ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

4. Характеристики набора реагентов

4.1. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Набор реагентов «HEPA-BCD-тест»

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
1. Технические характеристики		1
Внешний вид		
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-021-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-021-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-021-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
2. Функциональные характеристики		
1 Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM Ct≤30, HEX Ct≤30, ROX Ct≤30 и Cy5 Ct≤30.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2 Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО Ct по каналам FAM, ROX и Cy5 не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует) или Ct> 35, а по каналу HEX Ct≤32.	Раздел 7, пункт 7.8.2
3 Прохождение реакции в пробирках с КОС	В пробирках с КОС Ct по каналам FAM, ROX и Cy5 не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), а по каналу HEX Ct≤32.	Раздел 7, пункт 7.8.2
4 Прохождение реакции в пробирках с КОЧ	В пробирках с КОЧ по каналам FAM, ROX и Cy5 во всех повторях (не менее 4) Ct≤35, а по каналу HEX Ct≤32.	Раздел 7, пункт 7.8.2

Примечание: При проведении контрольной ПЦР в качестве КОЧ и КОС используют:

- Контрольный образец для определения чувствительности-В (КОЧ-3), представляет собой смесь плазмид с синтетическими вставками

фрагмента геномной ДНК вируса гепатита В с концентрацией : копий/мл в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

- Контрольный образец для определения чувствительности-С (КОЧ-С), представляет собой смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента геномной кДНК вируса гепатита С (HCV_pos) с концентрацией 250 копий/мл в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

- Контрольный образец для определения чувствительности-D (КОЧ-D), представляет собой смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента геномной кДНК вируса гепатита D (HDV_pos) с концентрацией 250 копий/мл в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

- Контрольный образец специфичности (КОС), представляющий собой раствор геномной ДНК человека, выделенной из клеточной линии Jurkat с концентрацией 2 000 копий на 5 мкл (400 000 копий/мл) в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

Образцы КОЧ-В, КОЧ-С, КОЧ-D и КОС в объеме 100 мкл проходят этап выделения НК с добавлением 10 мкл ВКО согласно инструкции.

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к ДНК вируса гепатита В и РНК вирусов гепатита С и D.

Подтверждена возможность обнаружения РНК вируса гепатита D и различных генотипов гепатита В (А, В, С, D, Е, F, G) и гепатита С (от 1а до 6) с использованием стандартных образцов NIBSC:

- Международный стандарт 1st WHO International Reference Panel for Hepatitis B Virus Genotypes for Nucleic Acid Amplification Techniques -Based Assays PEI code 5086/08, состоящий из образцов лиофилизированной HBV-положительной плазмы, охватывающий наиболее распространенные генотипы HBV. Образцы 1-3 (генотип А), Образцы 4-6 (генотип В), Образцы 7-9 (генотип С), пробы 10-12 (генотип D), проба 13 (генотип Е), проба 14 (генотип F) и образец 15 (генотип G).

- 4th HCV RNA Genotype Panel for Nucleic Acid Amplification Techniques. NIBSC code: 14/290, состоящий из семи флаконов, представляющих шесть основных генотипов: флакон 14/276 - HCV генотип 1а, 14/278 - HCV генотип 1б, 14/280 - HCV генотип 2а, 14/282 - HCV генотип 3а, 14/284 - генотип HCV4г, 14/286 - HCV генотип 5а, 14/288 - генотип 6I.

-Международный стандарт 1st World Health Organization International Standard for Hepatitis D Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays PEI code 7657/12, с концентрацией 575 000 МЕ/мл.

По результатам исследования со стандартными образцами NIBSC подтверждена специфичность набора реагентов «HEPA-BCD-тест» по отношению к ДНК вируса гепатита В (генотипы А, В, С, D, Е, F, G) и РНК вирусов гепатита С (генотипы от 1а до 6) и D.

4.2.2 Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

В соответствии ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом международных рекомендаций CLSI EP-17A2 предел обнаружения (LOD) определяли методом анализа разведений Международных стандартов ВОЗ:

- Международный стандарт WHO International Standard 4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT NIBSC code: 10/266, с концентрацией 955 000 МЕ/мл (~ 5,98 log10 МЕ/мл)

- Международный стандарт WHO International Standard 6th WHO International Standard for hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques NIBSC code: 18/184, с концентрацией 257 000 МЕ/пробирке (~ 5,41 log10 МЕ/пробирке)

- Международный стандарт 1st World Health Organization International Standard for Hepatitis D Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays PEI code 7657/12, с концентрацией 575 000 МЕ/мл

в HBV/HCV/HDV-негативной плазме крови K2-ЭДТА человека в диапазоне предполагаемого предела обнаружения для образцов объемом 100 мкл.

Каждое из 7 разведений анализировали с помощью набора реагентов «HEPA-BCD-тест» в течение 3 разных дней в 30 повторях для подсчета процента положительных результатов. Результаты определялись в соответствии с международными рекомендациями CLSI EP-17A2 пробит-анализом.

Аналитическая чувствительность: предел обнаружения 14/282 - HCV генотип 3a, 14/284 - генотип HCV4g, 14/286 - HCV (LOD) для образцов плазмы крови К2-ЭДТА человека объемом 100 мкл составила: генотип 5a, 14/288 - генотип 6l.

Аналит	Используемый амплификатор	Концентрация, МЕ/мл (LOD) с доверительной вероятностью 95%	Доверительный интервал 95%
ДНК HBV	ДТпрайм	47,8	95%ДИ: 46,37-49,2
	CFX 96	48,4	95%ДИ: 46,97-49,8
	Rotor-Gene Q	48,1	95%ДИ: 46,67-49,5
	Quant Studio 5	48,8	95%ДИ: 47,37 - 50
РНК HCV	ДТпрайм	96,7	95%ДИ: 95,2-98,1
	CFX 96	97,0	95%ДИ: 95,5-98,4
	Rotor-Gene Q	105,9	95%ДИ: 104,4-107,1
	Quant Studio 5	97,1	95%ДИ: 95,6-98,5
РНК HDV	ДТпрайм	39,2	95%ДИ: 37,7-40,4
	CFX 96	38,8	95%ДИ: 37,3-40,1
	Rotor-Gene Q	39,4	95%ДИ: 37,9-40,8
	Quant Studio 5	36,5	95%ДИ: 35,1-37,1

Полученные результаты подтвердили способность набора реагентов «HEPA-BCD-тест» выявлять генотипы А, В, С, D, Е, F, G вируса гепатита В в концентрации ~48 МЕ/мл и генотипы 1a, 1b, 2i, 3a, 4g, 5a, 6l вируса гепатита С в концентрации ~100 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл с верхним односторонним доверительным интервалом 95 %, превышающим ожидаемую частоту выявления 95 %.

4.2.3 Аналитическая специфичность: проверка эффекта потенциально интерферирующих веществ

Перечень проверенных потенциально интерферирующих веществ приведен в разделе 8.3 Инструкции.

На основании результатов исследования к ингибиторам ПЦР при проведении анализа отнесены следующие вещества:

1) антикоагулянты - гепарин в концентрации 0,15 МЕ/мл и цитрат натрия в концентрации 0,1 мМ/мл. Не допускается использование гепарина и цитрата натрия в качестве антикоагулянта при взятии периферической крови.

2) гепарин в концентрации 1 МЕ/мл, применяемый при антикоагулянтной терапии. Наличие гепарина в крови у пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии, может привести к получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

Прочие интерферирующие вещества в указанных концентрациях интерферентов не оказывают влияние на результаты качественного выявления и дифференциации вируса гепатита В, вируса гепатита С и D с помощью исследуемого набора «HEPA-BCD-тест».

4.2.4 Аналитическая специфичность: проверка эффекта потенциально перекрестных реагентов.

В рамках проведения технических испытаний подтверждено отсутствие ложноотрицательных и ложноположительных реакций соответственно с положительными по содержанию ДНК HBV и РНК HCV и HDV образцами и отрицательными образцами с добавлением ДНК следующих патогенов:

Для верификации предела обнаружения при тестировании различных генотипов вируса гепатита В (А, В, С, D, Е, F, G) вируса гепатита С (от 1a до 6) использовали образцы панелей стандартов NIBSC:

- Международный стандарт 1st WHO International Reference Panel for Hepatitis B Virus Genotypes for Nucleic Acid Amplification Techniques -Based Assays PEI code 5086/08, состоящий из образцов лиофилизированной HBV-положительной плазмы вируса гепатита С и D с помощью исследуемого набора «HEPA-BCD-тест».

3 (генотип А), Образцы 4-6 (генотип В), Образцы 7-9 (генотип D), пробы 10-12 (генотип D), проба 13 (генотип Е), образец 14 (генотип F) и образец 15 (генотип G).

- 4th HCV RNA Genotype Panel for Nucleic Acid Amplification Techniques. NIBSC code: 14/290, состоящий из семи флаконов представляющих шесть основных генотипов: флакон 14/276 - HCV генотип 1a, 14/278 - HCV генотип 1b, 14/280 - HCV генотип 1c, 14/282 - HCV генотип 3a, 14/284 - генотип HCV4g, 14/286 - HCV генотип 5a, 14/288 - генотип 6l.

- из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США), *Propionibacterium acnes* (ATCC® 29399™), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, Strain Seattle 1945 (ATCC® 25923™), *Staphylococcus epidermidis*, FDA Strain PCI 1200 (ATCC® 12228™), *Staphylococcus haemolyticus* ATCC™ 29970™.
- из коллекции «ГКПМ-ОБОЛЕНСК»: *Escherichia coli* M-17 (номер штамма В-2929), *Candida albicans* NCTC 885-653 (номер штамма В-7940)

в максимальной концентрации от 10^6 до 10^7 клеток на мл. Неспецифических реакций не выявлено.

4.2.5 Прецизионность в условиях повторяемости воспроизводимости:

1. Коэффициент вариации в условиях повторяемости составляет не более 3%.
2. Коэффициент вариации в условиях воспроизводимости набора составляет не более 5%.

4.2. Характеристики клинической эффективности

4.2.1 Оценка диагностической чувствительности диагностической специфичности

Для проведения клинических испытаний было использован образец плазмы крови К2-ЭДТА человека, полученных из ба остаточных аликутов, сформированного в процессе рутинной лечеб диагностической практики, от пациентов:

- 41 образец плазмы крови К2-ЭДТА человека, от пациентов выявленным вирусом гепатита С в возрасте от 12 лет до 65 лет (от женщин и 24 мужчин);
- 30 образцов плазмы крови К2-ЭДТА человека, от пациентов выявленным вирусом гепатита В в возрасте от 6 месяцев до 85 лет (от женщин и 16 мужчин)
- 10 образцов плазмы крови К2-ЭДТА человека, от пациентов выявленным вирусом гепатита В и D в возрасте от 18 лет до 65 лет (от женщин и 6 мужчин),

имеющие различные стадии соответствующего заболевания.

Такое количество образцов было набрано в соответствии с рекомендациями Международного руководства CLSI EP09-A3, а также соответствии с требованиями ГОСТ Р 51352-2013.

Для оценки межсерийной сходимости исследования клинических образцов были проведены исследуемым медицинским изделием в ла

Для проведения ПЦР-исследования были использованы следующие амплификаторы:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США);
- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия);
- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США).

Из всех протестированных образцов клинического материала 10 образцов являются истинно положительными по содержанию НК вирусов гепатитов В и D, 30 образцов - истинно положительными по содержанию ДНК вируса гепатита В и 41 образец - истинно положительный по содержанию РНК вируса гепатита С. Результаты качественного выявления НК вирусов гепатитов В, С, D совпали при тестировании испытуемым набором реагентов «HEPA-BCD-тест», а также наборами сравнения «АмплиСенс® HBV/HDV-FL» и «АмплиСенс® HCV-FL» для всех исследованных образцов клинического материала (дискордантных образцов не выявлено).

Результаты изучения диагностических характеристик исследуемого набора реагентов по отношению к специфическим часткам НК вирусов гепатитов В, С, D приведены в таблице 11.

Таблица 11

Определяемый аналит	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с вероятностью 95 %
ДНК вируса гепатита В	80	144	100% (95% ДИ: 95,49%-100%)	100% (95% ДИ: 97,47%-100%)
РНК вируса гепатита С	82	142	100% (95% ДИ: 95,60%-100%)	100% (95% ДИ: 97,44%-100%)
РНК вируса гепатита D	20	204	100% (95% ДИ: 83,16%-100%)	100% (95% ДИ: 98,21%-100%)

4.2.2 Оценка перекрестной реактивности

Для оценки перекрестной реактивности в клинических испытаниях испытуемым набором реагентов «HEPA-BCD-тест» были исследованы также 35 образцов, являющиеся истинно отрицательными, не

содержащими исследуемые аналиты, но с подтвержденными зарегистрированными медицинскими изделиями, наличием следующих микроорганизмов: ВИЧ-1 – 2 образца, Аденовирус типа 5 – 3 образца, Вирус варицелла зостер – 1 образец, Цитомегаловирус – 2 образца, Staphylococcus aureus – 5 образцов, Вирус Эпштейн-Барр – 2 образца, Вирус гепатита А – 2 образца, Т-клеточный лимфотропный вирус человека 2 типа – 2 образца, Вирус герпеса человека, тип 6 – 2 образца, Папилломавирус человека – 3 образца, Вирус простого герпеса, 1 типа – 1 образец, Вирус простого герпеса, 2 типа – 3 образца.

Перекрестной реактивности не наблюдалось, неспецифических реакций выявлено не было.

4.2.3 Оценка специфичности

Специфичность «Набора реагентов для одновременного качественного выявления НК вирусов гепатитов В, С, D методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-BCD-тест», производства ООО «ТестГен» определяли методом тестирования отрицательных образцов, содержащих НК вирусов гепатитов В, С, D образцов от индивидуальных доноров и беременных женщин.

В общей сложности тестировали 54 образца плазмы крови К2-ЭДТА набором реагентов «НЕРА-BCD-тест». 54 образца плазмы крови К2-ЭДТА оказались отрицательными по содержанию НК вирусов гепатитов В, С, D. При тестировании данной панели образцов специфичность теста «НЕРА-BCD-тест» составила 100,0 % (при одностороннем 95% доверительном интервале 99,5 %). Нижняя граница доверительного интервала специфичности с доверительной вероятностью 95 % была определена по методу Клоппера и Пирсона (Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper, C., & Pearson, E. (1934). The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial. Biometrika, 26(4), 404–413. doi:10.2307/2331986).

Для проведения ПЦР-исследования набором реагентов «НЕРА-BCD-тест» были использованы амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДиТехнология», Россия);
- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США);
- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия);
- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США).

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. Потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
2. Загрязнение клинического материала ингибирующими веществами в концентрациях, превышающих допустимые;
3. Контаминация реакционных смесей и образцов исследуемой НК содержимым из пробирки ПКО или продуктами амплификации;
4. Проведение анализа с использованием пробы НК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);
5. Невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированного персонала;
6. Использование непригодного для применения набора (использование по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для одновременного качественного выявления НК вирусов гепатитов В, С, D методом мультиплексной ОТ-ПЦР «НЕРА-BCD-тест»» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 3, соответствует с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «НЕРА-BCD-тест», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «HEPA-BCD-тест», обладающей низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «HEPA-BCD-тест», не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работу с материалом, заражённым или подозрительным заражённостью, проводят в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к профилактике инфекционных болезней", МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-III групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдение персоналом правила биологической безопасности и требований организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Следует рекомендовать, изложенным в МУ «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (МУ 287-113), МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

При работе всегда следует выполнять следующие требования

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

2. при удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами амплификации лабораторной зоны, оборудования и реагентов;

– применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

– допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА I-II групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также лаборант со средним специальным медицинским образованием);

– не использовать набор по истечении срока годности;

– избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой; при контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании для реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Работа с набором реагентов осуществляется в рабочей зоне 3 для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Вортекс;
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема;
4. Холодильник от +2 °C до +8 °C с морозильной камерой, выше -16 °C;

5. Амплификатор¹ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофору FAM/Green и HEX/Yellow, например, CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

ВНИМАНИЕ! При работе с НК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free» и «RNase-free».

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, Axygen, США);
2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» 1,5 или 2,0 мл;
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (при использовании амплификатора планшетного типа) или оптически прозрачными стенками (в случае использования амплификаторов роторного типа) для ПЦР: пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл², или пробирки для ПЦР объемом 0,1, или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной пленкой (например, Axygen, США), совместимые с используемым амплификатором;
4. Халат и одноразовые перчатки без талька;
5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;

¹ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

² Убедитесь в совместимости пробирок для ПЦР с используемым амплификатором.

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл (например, ООО «ИнтерЛабСервис», Россия);

7. Набор для выделения НК из плазмы крови K2-ЭДТА (см. п. 8.2 Инструкции).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы нуклеиновых кислот, выделенные из плазмы крови K2-ЭДТА.

8.1. Процедура получения клинического материала

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012.

Забор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами II группы патогенности.

Забор материала на исследование

Взятие периферической крови проводится утром натощак в пробирку (вакуумную пробирку), содержащую раствор EDTA-K2 в качестве антикоагулянта, объемом 4 или 6 мл. Сразу после взятия крови пробирку перевернуть 3–4 раза для перемешивания крови с раствором EDTA-K2.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина и цитрата натрия в качестве антикоагулянта.

ВНИМАНИЕ! Наличие гепарина в крови у пациентов, проходящих на антикоагулянтной терапии, может привести к получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

Условия транспортирования и хранения исходного клинического материала – крови:

- при температуре от +2 °C до +8 °C – не более 6 часов;
 - при комнатной температуре – не более 2 часов.
- Кровь не замораживать.

В течение 2 часов (при хранении при комнатной температуре) или 6 часов (при хранении при температуре от +2 °С до +8 °С) после забора материала следует отобрать плазму, для чего пробирку кровью центрифугируют при 800–1600 g в течение 20 минут при комнатной температуре. После центрифугирования верхнюю фракцию (плазму) перенести в отдельные пластиковые пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл, свободную от ДНКаз и РНКаз.

Условия транспортирования и хранения плазмы крови К2-ЭДТА:

Допускается хранение плазмы при температуре от +2 °С до +8 °С до 5 суток, при температуре от -18 °С до -22 °С – до 3 месяцев, при температуре -70 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов плазмы.

Для выделения НК использовать не менее 100 мкл плазмы. Повышение аналитической чувствительности набора возможно благодаря использованию большего объема плазмы, если это предусмотрено используемым набором для выделения НК, а также уменьшению объема элюции.

В исключительных случаях допускается использование сыворотки крови, при этом следует учитывать снижение клинической чувствительности набора реагентов с сохранением аналитической чувствительности. Сыворотку хранить при температуре от +2 °С до +8 °С до 5 суток, при температуре от -18 °С до -22 °С – до 3 месяцев, при температуре -70 °С – длительно.

Предварительная обработка материала

Подготовка не требуется.

Учет, хранение, передача и транспортирование клинического материала, подозрительного на наличие вируса гепатитов, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности) (СанПиН 1.3.3118-13), действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов IV групп патогенности.

Утилизация клинического материала (класс В), чрезвычайно эпидемиологически опасных отходов, осуществля-

8.2 Процедура получения пробы НК человека, выделенной из плазмы крови К2-ЭДТА

Для выделения пробы НК человека из плазмы крови К2-ЭДТА рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009, производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/08867 от 13.10.2016 г.).

Во время процедуры выделения НК необходимо строго соблюдать протокол и требования инструкции применяемого набора реагентов.

К каждому исследуемому образцу плазмы К2-ЭДТА перед выделением следует добавить 10 мкл ВКО из набора реагентов «НЕРА-BCD-тест».

Образец ОКО также проходит процедуру выделения НК в объеме 100 мкл с добавлением 10 мкл ВКО. Если инструкцией производителя набора реагентов для выделения НК предусмотрено использование большего объема образца, следует довести объем ОКО до требуемого физиологическим раствором или ТЕ-буфером.

Условия возможного хранения анализируемых образцов НК:

- при +2 ... +8 °С не более 4 ч (рекомендуется),
- при -18 ... -22 °С не более недели,
- при температуре не выше -80 °С не более года.

8.3. Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «НЕРА-BCD-тест» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «НЕРА-BCD-тест», и, предположительно, влиять на способность набора реагентов выдавать достоверные результаты.

Интерферирующие вещества могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);

2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов. В данном случае, загрязнение клинического образца гемоглобином крови может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения НК;

3) вещества, встречающиеся при процедуре забора клинического материала - в данном случае, антикоагулянты.

Исследованные концентрации интерферирующих веществ, которые приведены в таблице 5.

Таблица 5

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества	
Гемоглобин	260 мкг/мл
Гепарин (антикоагулянт)	0,15 МЕ/мл
Цитрат натрия (антикоагулянт)	0,1 мМ/мл
EDTA-K2 (антикоагулянт)	0,5 мМ/мл
Холестерин	150 мг/дл
Триглицериды	250 мг/дл
Экзогенные интерферирующие вещества	
При антикоагулянтной терапии	
Гепарин	1 МЕ/мл
Препараты, назначаемые при вирусных гепатитах В, С, D	
Интерферон альфа	1000 МЕ/мл
Пегилированный интерферон альфа	0,036 мкг/мл
Препараты, назначаемые при вирусном гепатите В	
Ламивудин	0,02 мг/мл
Энтекавир	$0,1 \cdot 10^{-3}$ мг/мл
Телбивудин	0,12 мг/мл
Препараты, назначаемые при вирусном гепатите С	
Рибавирин	0,04 мг/мл
Нарлапревир	0,02 мг/мл
Паритапревир	0,015 мг/мл
Дасабувир	0,05 мг/мл
Софосбувир	0,08 мг/мл
Даклатасвир	0,012 мг/мл

Ледипасвир	0,018 мг/мл
Омбитасвир	0,0025 мг/мл
Препараты, назначаемые при вирусном гепатите D	
Булевиртид	0,0004 мг/мл

На основании результатов исследования к ингибиторам ПЦР при проведении анализа отнесены следующие вещества:

1) антикоагулянты - гепарин в концентрации 0,15 МЕ/мл и цитрат натрия в концентрации 0,1 мМ/мл. Не допускается использование гепарина и цитрата натрия в качестве антикоагулянта при взятии периферической крови.

2) гепарин в концентрации 1 МЕ/мл, применяемый при антикоагулянтной терапии. Наличие гепарина в крови у пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии, может привести к получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови у таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

— анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание);

— не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

— наличие гепарина в крови у пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии, может привести к получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови у таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

ВНИМАНИЕ! При работе с НК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free» и «RNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

Перед приготовлением реакционных смесей необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нём, с применением дезинфицирующих средств, пригодных для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20–30 минут.

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа НК, ОТ-ПЦР-буфером, смесью олигонуклеотидов, ОКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

2. Отобрать необходимое количество пробирок (с оптически прозрачными крышками или стенками – в зависимости от используемого типа детектирующего амплификатора) объёмом 0,1 или 0,2 мл для ПЦР из расчёта: количество исследуемых образцов + 1 ПКО + 1 ОКО, или взять планшет для ПЦР.

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

1. Подготовка ОТ-ПЦР;
2. Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени;
3. Интерпретация результатов.

А) Подготовка ОТ-ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для скапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объём реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции.

Для приготовления реакционной смеси на 1 реакцию необходимо:

1. ОТ-ПЦР-буфер – 5 мкл,
2. Смесь олигонуклеотидов – 15 мкл,

3. Образец (исследуемый образец НК, ПКО, ОКО) – 5 мкл.
Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл или планшет для ПЦР.

2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объёмом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: $(n+3) \times 5$ мкл ПЦР-буфера и $(n+3) \times 15$ мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов.

3. В каждую пробирку для ПЦР внести по 20 мкл приготовленной реакционной смеси.

4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 5 мкл выделенной НК. В пробирки для ПКО и ОКО препарат НК не вносится.

5. Внести в соответствующую пробирку 5 мкл ПКО.

6. Внести в соответствующую пробирку 5 мкл ОКО, прошедшего этап выделения НК.

7. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Б) Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени;

(производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации)

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки в центре термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ОТ-ПЦР указан в таблице 6.

³ Для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец в двух повторях.

Таблица 6 – Протокол ОТ-ПЦР

Стадия	Температура, °C	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	52	40:00	–	–
2	95	02:00	–	–
3	95	00:05	–	5
	60	00:15	–	
	67	00:30	–	
4	95	00:05	–	45
	60	00:15	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	67	00:30	–	

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификатора QuantStudio 5 необходимо произвести настройку оптических фильтров до запуска протокола амплификации (так как без данной настройки возможна регистрация сигнала VIC каналом ROX в случае $\Delta Rn > 100\,000$, что может привести к получению ложноположительных результатов)! Для этого в закладке «Method» нажать кнопку «Action», после чего в сплывающем меню выбрать «Optical filter settings», где в разделе «PCR Filter» оставить только следующие комбинации фильтров: x1 – m1, x2 – m2, x4 – m4, x5 – m5, x6 – m6.

3. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с установкой.

4. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red.

5. Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

6. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

11. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят по завершении ОТ-ПЦР автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала детекции на уровне, соответствующем 10–20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t по каналам детекции, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red (табл. 1). Учитываются только значения C_t , полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 4 – см. табл. 5).

Сначала необходимо оценить прохождение реакции и значения C_t в контрольных образцах. Интерпретацию результатов в исследуемых образцах начинают только при правильном прохождении ПКО и ОКО.

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификаторов Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene Q и аналогичных, активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal).

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для ОКО и ПКО должны быть получены следующие результаты (табл. 7).

Таблица 7 – Результаты исследования для ОКО и ПКО

Контрольный образец	Значения C_t по каналам детекции, соответствующим флуорофорам			
	FAM/Green	HEX/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
ОКО	> 35 или отсутствует	≤ 32	> 35 или отсутствует	> 35 или отсутствует
ПКО	≤ 30	≤ 30	≤ 30	≤ 30

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 7, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение

специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 7, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

Принципы интерпретации результатов отражены в таблице 8. Если для образца регистрируется рост флуоресценции специфического продукта по каналам FAM/Green, ROX/Orange или Cy5/Red раньше 15 цикла ($Ct < 15$), то это говорит о высокой первоначальной концентрации НК соответствующего вируса гепатита. В данном случае возможно получение ложноотрицательного результата для вируса гепатита, НК которого присутствует в низкой концентрации. Для исключения ложноотрицательных результатов рекомендуется повторно провести ОТ-ПЦР/ПЦР выделенного препарата НК или использования наборов реагентов для отдельного выявления НК соответствующих гепатитов.

Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация НК, присутствие ингибиторов в препарате НК, полученном из клинического материала, неверное выполнение протокола анализа, несоблюдение температурного режима ОТ-ПЦР и др.

Причиной получения сомнительного результата может служить маленькая концентрация вируса в клиническом образце.

В случае невалидного и сомнительного результата заключения не выдаётся, необходимо повторно взять у пациента биоматериал, заново провести анализ. При этом для сомнительных результатов рекомендуется проведение выделения НК из большего объёма плазмы.

Таблица 8 – Принцип интерпретации результатов в исследуемых клинических образцах

Значения Ct по каналам детекции, соответствующим флуорофорам (в скобках указаны целевые аналиты)				Результат
FAM / Green (HBV)	ROX / Orange (HCV)	Cy5 / Red (HDV)	HEX / Yellow (BKO)	
–	–	–	≤ 32	НК вирусов гепатитов В, С и D не обнаружена
–	–	–	> 32	результат невалидный
≤ 35			не уч.	обнаружена НК вируса, соответствующая каналу
> 35			не уч.	результат теста сомнительный для мишени, соответствующей каналу

Обозначения: «не уч.» – результат при интерпретации не учитывается; «–» – сигнал флуоресценции отсутствует.

При повторении сомнительного результата повторить исследование набором реагентов другого производителя или другим методом.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

Набор реагентов «HEPA-BCD-тест» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от минус 18 до минус 22 °С в течение всего срока годности набора, допускается хранение при температуре от 2 до 8 °С не более 30 суток.

Допускается заморозка/оттаивание набора «HEPA-BCD-тест» не более 10 раз.

После вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, не подлежит применению.

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов «HEPA-BCD-тест» следует в транспорте всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Транспортировать при температуре от минус 18 до минус 22 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8 °С до 30 суток, или при температуре от 15 до 25 °С не более 5 суток.

Атмосферное давление не контролируется, так как не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования набора реагентов в течение всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования, подготовленными хладоэлементами. Тип, объём и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер, транспортируемые наборы реагентов, а также объём термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Срок годности

Срок годности набора реагентов «HEPA-BCD-тест» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при

соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истёкшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от минус 18 до минус 22 °С.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

Один час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета, кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (МУ 287-113).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «HEPA-BCD-тест» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует качество безопасности набора реагентов «HEPA-BCD-тест» в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования, хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов реагентов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с ограниченной ответственностью «ТестГен»
(ООО «ТестГен»),
432072, г. Ульяновск, 44-й Инженерный проезд, дом 9, офис 101
Тел.: +7 (499) 705-03-75
www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 (927) 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Инструкция по применению соответствует требованиям Приказа Минздрава России от 09.01.2014 №2н, Приказа Минздрава России от 19.01.2017 № 11н, ГОСТ 51088-2013.

Приложение А

Набор реагентов для одновременного качественного выявления НК вирусов гепатитов В, С, D методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ «HEPA-BCD-тест» соответствует следующим межгосударственным стандартам на продукцию:

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2011	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.
ГОСТ Р EN 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ГОСТ Р 56894-2016	Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая

	изготовителем(маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования
ГОСТ 2.114-2016	Единая система конструкторской документации. Технические условия
ГОСТ 2.104-2006	Единая система конструкторской документации (ЕСКД). Основные надписи
ГОСТ Р 1.3-2018	Стандартизация в Российской Федерации. Технические условия на продукцию. Общие требования к содержанию, оформлению, обозначению и обновлению

П р и м е ч а н и е – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

39 (тридцать девять) листов
Должность: ген. директор
Тороповский А.Н.

