



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А.Н. Тороповский
(21) января 2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для количественного выявления РНК
вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР-РВ
«НЕРА-С-тест-Q»**

ТУ 21.20.23-019-97638376-2020

Содержание

Список сокращений

Список сокращений	3	В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:
Введение.....	4	
1. Назначение.....	6	
2. Принцип метода	6	ПЦР полимеразная цепная реакция
3. Состав набора реагентов	9	ОТ обратная транскрипция
4. Характеристики набора реагентов	11	ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов	2	кДНК комплиментарная ДНК
6. Меры предосторожности при работе с набором	23	НК рибонуклеиновая кислота
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	26	НСV вирус гепатита С
8. Анализируемые образцы	27	ВКО внутренний контрольный образец
9. Подготовка компонентов набора для исследования.....	31	ОКО отрицательный контрольный образец
10. Проведение анализа	32	ПКО положительный контрольный образец
11. Регистрация и интерпретация результатов.....	34	КО-1 калибровочный образец № 1
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов	38	КО-2 калибровочный образец № 2
13. Утилизация	39	КОЧ контрольный образец для определения чувствительности
14. Гарантийные обязательства, контакты	40	КОС контрольный образец специфичности
Приложение А	41	

Введение

Инфекция вирусом гепатита С – основная причина острых первых 4-12 недель лечения и после окончания курса терапии хронических заболеваний печени. Хроническая инфекция может привести к циррозу и раку печени. Течение хронического гепатита С может характеризоваться внепечёночными проявлениями, среди которых наиболее острые – криоглобулинемический васкулит и криоглобулинемический нефрит и В-клеточная лимфома. Оценка вирусной нагрузки гепатита С позволяет скорректировать терапию и проводить мониторинг её эффективности.

Целевой анализ: специфичные участки геномной РНК гепатита С (hepatitis C, HCV)

Научная обоснованность целевого анализа заключается в его специфичности (уникальности последовательности РНК) отношении генома вируса гепатита С.

Вирус гепатита С – представитель семейства флавивирусов (Flaviviridae). Геном представлен однонитевой линейной молекулой РНК. Важной особенностью генома является высокая гетерогенность. HCV благодаря высокой мутационной активности способен избегать воздействия защитных механизмов иммунной системы. Существует 6 генотипов и множество субтипов вируса, которые имеют разные значения для прогноза развития заболевания и эффективности противовирусной терапии.¹

Выявление РНК HCV свидетельствует о размножении вируса в организме и является методом диагностики заболевания. Генетический материал вируса можно обнаружить с помощью ПЦР через 10-12 дней после инфицирования – в этот период специфические антитела, которые образуются через несколько месяцев после заражения, отсутствуют и биохимические показатели функции печени находятся в пределах референсных значений.

Количественное определение вирусной нагрузки с учетом генотипа HCV позволяет контролировать проводимую терапию и прогнозировать течение болезни.

Эффективность лечения оценивается по количеству РНК до и во время терапии. Обычно вирусная нагрузка крови снижается несколько раз за первые три месяца успешного лечения. Пр

эффективной терапии вирусная нагрузка уменьшается на два порядка в течение первых 4-12 недель лечения и после окончания курса терапии не обнаруживается. Отсутствие снижения вирусной нагрузки через 12 недель с начала лечения свидетельствует на его неэффективность. Рекомендовано проводить анализ до начала терапии, на 4-й, 12-й и 24-й неделях лечения и через 24 недели после окончания курса. Длительность терапии и периодичность количественного определения РНК вируса гепатита С зависит от генотипа вируса и степени повреждения печени.²

Область применения набора реагентов: клиническая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: подозрение на инфицирование вирусным гепатитом С и определение вирусной нагрузки у пациентов с выявленным вирусом гепатита С для выбора адекватной терапии и оценки её эффективности.

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

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия: популяционных, демографических аспектов применения набора реагентов «HEPA-C-тест-Q» не выявлено.

Стерильность: изделие не стерильно.

¹ Гепатит С. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) Информационный бюллетень. 2020.

² Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С. Министерство здравоохранения РФ. - М. 2014.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «НЕРА-С-тест-Q» предназначен для количественного определения РНК вируса гепатита С (hepatitis C, HCV) методом одностадийной аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в пробе РНК, выделенной из плазмы крови К2-ЭДТА человека, у пациентов с подозрением на инфицирование вирусом гепатитом С и пациентов с выявленным вирусом гепатита С для выбора адекватной терапии и оценки её эффективности.

Функциональное назначение: полученные результаты могут использоваться для диагностики вирусного гепатита С, определения адекватной терапии и оценки её эффективности. Результаты учитываются в комплексной диагностике заболевания.

Потенциальные потребители медицинского изделия

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

2. Принцип метода

Метод

Одностадийная аллель-специфическая полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ).

Тип анализируемого образца

Материалом для исследования являются пробы РНК, выделенные из плазмы крови К2-ЭДТА человека.

Принцип определения

Количественное определение РНК вируса гепатита С методом мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в пробах РНК, 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 продуктов

3. Интерпретация результатов.

С пробами РНК проводятся реакции одностадийной обратной транскрипции и амплификации специфических участков при помощи специфичных к ним праймеров в реакционном буфере.

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

В составе смесей олигонуклеотидов присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые

гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой РНК-мишени и гидролизуются (разрушаются) *Taq*-полимеразой, в

нарастание интенсивности флуоресценции по соответствующему диапазону оптического спектра. Это позволяет регистрировать накопление специфичного продукта амплификации путём

измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

Набор содержит реагенты для определения высокоспецифичных участков (мишеней) геномной РНК вируса гепатита С, а также внутреннего контрольного образца (ВКО) (табл. 1).

ВКО позволяет оценить качество и эффективность выделения РНК и возможного наличия ингибиторов амплификации в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным

результатам.

Для построения калибровочной прямой, необходимой для определения концентраций геномной РНК вируса гепатита С в исследуемом образце, используются калибровочные образцы КО-1 и КО-2.

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору	
FAM / Green	HEX / Yellow
РНК вируса гепатита С	ВКО

Ограничения метода

Возможная причина получения ложноположительного результата – контаминация на этапе выделения РНК или проведения реакции ОТ-ПЦР. Ложноположительный результат может быть выявлен с помощью отрицательного контрольного образца.

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

Использование набора с истёкшим 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 МД. В диагностических целях результаты должны использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования другими тест-системами (например, определение концентрации анти-НСV с помощью иммуноферментного или иммунохемилюминесцентного анализа) и применяемой терапией.

При очень низкой вирусной нагрузке (менее 48 МЕ/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 «НЕРА-С-тест-Q» выпускается в одной форме комплектации- «НЕРА-С-тест-Q».

Количество анализируемых проб

Набор реагентов «НЕРА-С-тест-Q» рассчитан на 96 реакций, что соответствует определению 88 (44 при постановках в дублях) исследуемых образцов, калибровочных образцов, отрицательных и положительных контрольных образцов при единичном запуске амплификатора на 96 лунок или 10 единичным постановкам исследуемых образцов с калибровочными, отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Состав набора реагентов

Таблица 2 – Состав набора реагентов «НЕРА-С-тест-Q»

№ п/п	Название реагента	Описание	Количество, объём
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, 50 мкл
4.	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1 000 мкл
5.	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 950 мкл
6.	КО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1 500 мкл
7	КО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1 500 мкл

Примечание: Эксплуатационная документация (инструкция по применению и паспорт качества) не входит в состав изделия, но входят в комплект поставки изделия. Набор реагентов, для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер 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 поставляемую партию изделия.

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

Смесь олигонуклеотидов готова к использованию и содержит праймеры и зонды, предназначенные для выявления специфических мишеней – см. таблицу 1. Смесь олигонуклеотидов находится в 10 водном растворе ТЕ (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА), свободном нуклеаз.

ПКО готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемого фрагмента геномной кДНК вируса гепатита С с концентрацией 1886792 МЕ/мл и фрагмента генома бактериофага в 10 % ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

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

ВКО готов к использованию и представляет собой препарат армированной РНК.

КО-1 представляет собой смесь плазмидных РНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов РНК вируса гепатита С с концентрацией 188679 МЕ/мл в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

КО-2 представляет собой смесь плазмидных РНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов РНК вируса гепатита С с концентрацией 566 МЕ/мл в ТЕ-буфере (10 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 «НЕРА-С-тест-Q»

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
1. Технические характеристики		
1.1. 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
КО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
КО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
1.2. Комплектность		
	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-019-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
1.3. Маркировка		
	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-019-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
1.4. Упаковка		
	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-019-97638376-2020	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.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.2 Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM Ct>35 или не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), а по каналу HEX Ct≤32.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.3 Прохождение реакции в пробирках с КОС	В пробирках с КОС по каналу FAM Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), а по каналу HEX Ct≤32.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.4 Прохождение реакции в пробирках с КОЧ	В пробирках с КОЧ по каналу FAM во всех повторях (не менее 4) Ct≤35 и при значении стандартного отклонения в повторях КОЧ не более 5%, а по каналу	Раздел 7, пункт 7.8.2

	HEX Ct≤32.	концентрации $\geq 0,98$, что подтверждает возможность обнаружения и количественного определения испытуемым набором реагентов «НЕРА-С-тест-Q» в равной степени различных генотипов (от 1a до 6) гепатита С. Максимальное отклонение средней концентрации полученной набором реагентов «НЕРА-С-тест-Q» в двух повторях для стандартных образцов составило 0,05 log ₁₀ от log ₁₀ концентрации, установленной с помощью набора АмплиСенс® HCV-Монитор-FL" по ТУ 9398-035-01897593-2012, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, России (регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00577 от 27.12.2019).
2.5 Тест на "линейность"	Коэффициент корреляции КО-1, КО-2 и стандартного образца (СО) не менее 0,98	Раздел 7.8.5
2.6 Тест на прецизионность: коэффициент вариации (КВ) в условиях повторяемости	Коэффициент вариации Ct у повторов каждого калибровочного образца КО-1 и КО-2 в условиях повторяемости составляет не более 5%.	Раздел 7.8.8
2.6 Тест на правильность определения концентрации	Полученное значение концентрации РНК вируса гепатита С должно соответствовать концентрации, приведённой в паспорте стандартного образца, с допуском $\pm 0,4 \lg$ концентрации.	Раздел 7.8.2

4.2.2 Предел обнаружения (LOD)

По результатам исследования предел обнаружения РНК HCV в образцах плазмы крови К2-ЭДТА:

- объемом 100 мкл с частотой выявления 95 % для амплификатора ДТпрайм – 47,8 МЕ/мл (95%ДИ: 46,37-49,23), CFX 96 – 48,8 МЕ/мл (95%ДИ: 47,37-50,23), Rotor-Gene Q – 47,6 МЕ/мл (95%ДИ: 46,17-49,03), Quant Studio 5 – 47,8 МЕ/мл (95%ДИ: 46,37-49,23).

- объемом 1000 мкл с частотой выявления 95% для амплификатора ДТпрайм – 7,21 МЕ/мл (95%ДИ: 5,78-8,64), CFX 96 – 8,20 МЕ/мл (95%ДИ: 6,77-9,63), Rotor-Gene Q – 7,58 МЕ/мл (95%ДИ: 6,15-9,01), Quant Studio 5 – 6,91 МЕ/мл (95%ДИ: 5,48-8,34).

4.2.3 Предел обнаружения при тестировании различных генотипов (от 1a до 6) HCV. Результаты исследования с использованием стандарта NIBSC - 4th HCV RNA Genotype Panel for Nucleic Acid Amplification Techniques. NIBSC code: 14/290, состоящего из семи флаконов, представляющих шесть основных генотипов: флакон 14/276 - HCV генотип 1a, 14/278 - HCV генотип 1b, 14/280 - HCV генотип 2i, 14/282 - HCV генотип 3a, 14/284 - HCV генотип 4g, 14/286 - HCV генотип 5a, 14/288 - HCV генотип 6i, подтвердили способность набора реагентов «НЕРА-С-тест-Q» выявлять генотипы 1a, 1b, 2i, 3a, 4g, 5a, 6i в концентрации ~48 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл, ~7 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 1000 мкл с верхним односторонним доверительным интервалом 95 %, превышающим ожидаемую частоту выявления 95 %.

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

- контрольный образец для определения чувствительности (КОЧ) представляющий собой смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента геномной кДНК вируса гепатита С и фрагмента генома бактериофага в 10 % ТЕ-буфере (10 mM Трис, 1 mM ЭДТА) концентрацией 250 копий в 1 мл каждой.

- контрольный образец специфичности (КОС), представляющий собой смесь раствор геномной ДНК человека, выделенной из клеток линии Jurkat с концентрацией 1 000 копий на 5 мкл (200 000 копий/мл).

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Набор реагентов «НЕРА-С-тест-Q» специфичен отношению к геномной РНК гепатита С (hepatitis C, HCV).

Для набора реагентов «НЕРА-С-тест-Q» в качестве областей для гибридизации праймеров и зондов выбраны области 5'-UTR консервативные у генотипов 1 – 8.

Подтверждена возможность обнаружения и количественного определения в равной степени различных генотипов HCV. При проведении тестирования с использованием образцов панели HCV RNA Genotype Panel for Nucleic Acid Amplification Techniques NIBSC code: 14/290 во всех полученных значениях коэффициента корреляции R^2 ожидаемой концентрации HCV и полученной

4.2.4 Предел количественного определения (LOQ)

образцах плазмы крови К2-ЭДТА:

- объемом 100 мкл с доверительной вероятностью 95% амплификатора ДТпрайм – 142,8 МЕ/мл (95%ДИ: 141,3 – 144, CFX 96 – 143,3 МЕ/мл (95%ДИ: 143,3-146,2), Rotor-Gene Q – 144,7-147,5).

- объемом 1000 мкл с доверительной вероятностью 95% амплификатора ДТпрайм – 19,2 МЕ/мл (95%ДИ: 17,7-20,6), CFX – 20,4 МЕ/мл (95%ДИ: 18,9-21,8), Rotor-Gene Q – 18,5 МЕ/мл (95%ДИ: 17,0-19,9), QuantStudio 5 – 19,5 МЕ/мл (95%ДИ: 18,1-20,5).

4.2.5 Верификация предела количественного определения (LOQ) при тестировании различных генотипов (от 1a до 6) HCV

Результаты исследования с использованием стандарта NIBSC – HCV RNA Genotype Panel for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 14/290, состоящего из семи флаконов, представляющих шесть основных генотипов: флакон 14/276 - HCV генотип 1a, 14/280 - HCV генотип 1b, 14/282 - HCV генотип 2i, 14/284 - генотип HCV4g, 14/286 - HCV генотип 5a, 14/288 - генотип 6i, подтвердили предел количественного определения (LOQ) набора реагентов «HEPA-C-тест-Q» по отношению к генотипам от 1a до 6 в концентрации ~ 145 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл, ~20 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 1000 мкл с верхним односторонним доверительным интервалом 95 %, превышающим ожидаемую частоту выявления 95 %.

4.2.6 Линейный диапазон измерения исследуемого набора реагентов «HEPA-C-тест-Q»:

- в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл линейный диапазон от 145 МЕ/мл до $1,89 \cdot 10^7$ МЕ/мл, максимальное отклонение от линии регрессии не выше чем $\pm 0,18 \log_{10}$.

- в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 1000 мкл линейный диапазон от 20 МЕ/мл до $1,89 \cdot 10^7$ МЕ/мл, максимальное отклонение от линии регрессии не выше чем $\pm 0,14 \log_{10}$.

4.2.7 Верификация линейного диапазона измерения при тестировании различных (от 1a до 6) HCV.

Линейный диапазон измерения набора реагентов «HEPA-C-тест-Q» при тестировании от 1a до 6:

- в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл: линейный диапазон от 145 МЕ/мл до $1,89 \cdot 10^7$ МЕ/мл, максимальное отклонение от линии регрессии не выше чем $\pm 0,11 \log_{10}$.

- в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 1000 мкл: линейный диапазон от 20 МЕ/мл до $1,89 \cdot 10^7$ МЕ/мл, максимальное отклонение от линии регрессии не выше чем $\pm 0,10 \log_{10}$.

4.2.8 Метрологическая прослеживаемость контрольных образцов – ПКО, КО-1, КО-2, входящих в состав набора реагентов «HEPA-C-тест-Q»

проведена с использованием Международного стандарта WHO International Standard 6th WHO International Standard for hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (NIBSC code: 18/184). Приписанная концентрация КО-1 составляет 88679 МЕ/мл, КО-2 – 566 МЕ/мл, ПКО – 1886792 МЕ/мл.

На основе полученных результатов процесса калибровки и стандартизации можно заключить, что набор реагентов «HEPA-C-тест-Q» обеспечивает количественные значения для стандарта Международного стандарта WHO International Standard 4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT NIBSC code: 10/266, которые аналогичны ожидаемым значениям с отклонением не более $\pm 0,05 \log_{10}$ МЕ/мл (неопределенность).

4.2.9 Прецизионность в условиях повторяемости и воспроизводимости:

1. Коэффициент вариации в условиях повторяемости набора реагентов составляет не более 3%.

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

4.3. Характеристики клинической эффективности

4.3.1 Специфичность

Специфичность «Набора реагентов для количественного выявления РНК вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР. «НЕРА-С-тест-Q», производства ООО «ТестГен» определены при проведении анализа отнесены следующие вещества: методом тестирования отрицательных по содержанию РНК Н₁ образцов от индивидуальных доноров и беременных женщин. Статус по отношению к РНК вируса гепатита С в образцах (использование гепарина и цитрата натрия в качестве антикоагулянта установлен Набором реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизацией флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® HCV-FL" по ТУ 019-01897593-2012, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия (РУ № ФСР 2011/10235 11.04.2019).

В общей сложности тестировали 54 образца плазмы крови ЭДТА двумя лотами набора реагентов «НЕРА-С-тест-Q». Образца плазмы крови К2-ЭДТА оказались отрицательными по содержанию РНК HCV. При тестировании данной панели образцов специфичность теста «НЕРА-С-тест-Q» составила 100,0 % (при одностороннем 95%-м доверительном интервале 99,5 %).

Нижняя граница доверительного интервала специфичности 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), 413. doi:10.2307/2331986).

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

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

4.3.2 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 «НЕРА-С-тест-Q», производства ООО «ТестГен» определены 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, получающих антикоагулянтную терапию, может привести к получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови у таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

Прочие интерферирующие вещества в указанных концентрациях интерферентов не оказывают влияния на результаты теста. Отрицательный результат в тесте «НЕРА-С-тест-Q» был получен для всех отрицательных по содержанию РНК HCV образцов, положительный результат был получен для всех положительных по содержанию РНК HCV образцов. Кроме того, средний $\log_{10}$ титра каждого HCV-позитивного образца, содержащего потенциально интерферирующие вещества, находился между $-0,03 \log_{10}$ и $0,02 \log_{10}$ среднего $\log_{10}$ титра соответствующего положительного образца.

4.3.3 Аналитическая специфичность: проверка эффекта потенциально перекрестных реагентов.

Результаты показали, что при испытании 30 образцов плазмы крови К2-ЭДТА от пациентов, в которых показано отсутствие РНК вируса гепатита С (отрицательные образцы), но с подтвержденным наличием ДНК/РНК следующих микроорганизмов: ВИЧ-1 - 2 образца, Аденовирус типа 5- 3 образца, Вирус варицелла зостер- 1 образец, Цитомегаловирус - 2 образца, Staphylococcus aureus- 2 образца, Вирус Эпштейн-Барр - 2 образца, Вирус гепатита А - 1 образец, Вирус гепатита В - 3 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 – 4 образца, Вирус простого герпеса, 2 типа – 4 образца, перекрестной реактивности не наблюдалось. Количественного выявления РНК вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-С-тест-Q», производства ООО «ТестГен», LOT: 202111-425, и У – концентрация РНК HCV с использованием испытываемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления РНК вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-С-тест-Q», производства ООО «ТестГен», LOT: 202111-426.

Положительный результат был получен для образцов. Кроме того, средний $\log_{10}$ титра каждого HCV-позитивного образца, содержащего потенциально перекрестных реагентов, находится между $-0,09 \log_{10}$ и $0,07 \log_{10}$ среднего $\log_{10}$ титра соответствующего положительного образца.

4.3.4 Аналитическая чувствительность: обнаружения (LOD) для генотипов от 1a до 6

Клинические образцы и образцы панели NIBSC: 4th HCV RNA Genotype Panel for Nucleic Acid Amplification Techniques. NIBSC code: 14/290, состоящего из семи флаконов, представляющих шесть основных генотипов: флакон 14/276 - HCV генотип 1a, 14/278 - HCV генотип 1b, 14/280 - HCV генотип 2i, 14/282 - HCV генотип 2j, 14/284 - генотип HCV4r, 14/286 - HCV генотип 5a, 14/288 - генотип 6i, разводили в плазме крови К2-ЭДТА до концентрации 10^6 МЕ/мл установленной производителем с использованием международного стандарта WHO International Standard 6th WHO International Standard for hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques. NIBSC code: 18/184 (генотип 1b), определенным на основании пробит-анализа 95 % частоты выявления LoD (48 МЕ/мл в образце плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл, 7 МЕ/мл в образце плазмы крови К2-ЭДТА объемом 1000 мкл).

Полученные результаты подтвердили способность набора реагентов «НЕРА-С-тест-Q» выявлять генотипы от 1a до 6 HCV в клинических образцах, полученных при помощи двух лотов концентрации 48 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл, 7 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 1000 мкл с верхним односторонним доверительным интервалом 95 %, превышающим ожидаемую частоту выявления 95 %.

4.3.5 Результаты определения межлотовой корреляции (плазма крови К2-ЭДТА человека).

Для определения межлотовой корреляции результатов измерений в клинических образцах в соответствии с международным руководством CLSI EP09-A3 строилась диаграмма рассеяния зависимости переменной X – концентрация РНК HCV

Тип образца	Ед. изм.	Используемый амплификатор	Кол-во проб	Кэфф. коррел.	Пересечение	Наклон
Плазма крови К2-ЭДТА человека	$\log_{10}$ МЕ/мл	ДТпрайм	48	0,991	0,0593	0,9869
		CFX 96	48	0,9937	-0,021	1,0028
		Rotor-Gene Q	48	0,9924	0,1216	0,9622
		Quant Studio 5	48	0,9915	0,0281	0,9922

Коэффициент корреляции R^2 при проведении анализа на каждом из используемых амплификаторов составил более 0,99. В соответствии с рекомендациями документа CLSI EP09-A3 с использованием метода регрессии и корреляции можно сделать вывод о высокой силе корреляционной связи концентрации РНК HCV в клинических образцах, полученных при помощи двух лотов испытываемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления РНК вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-С-тест-Q», производства ООО «ТестГен».

4.3.6 Сравнение методов: точность.

В 48 клинических образцах была определена концентрация РНК HCV с использованием испытываемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления РНК вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-С-тест-Q» в двух сериях с использованием амплификаторов, рекомендованных производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-

Технология», Россия), регистрационное удостоверение № 2011/10228 от 03 марта 2011 г.;

- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2008/03399 от 21 июня 2016 года;

- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010;

- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США), регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8446 от 06 июня 2019 года.

Полученные результаты сравнивались с результатами, полученными с использованием набора сравнения «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, (регистрационное удостоверение № ФСЗ 2007/00577 от 27.12.2019).

Результаты статистической обработки полученных данных по сравнению методов (точность) в соответствии с рекомендациями документа CLSI EP09-A3 с использованием метода регрессии

корреляции.

	Тип образца	Ед. изм	Используемый амплификатор	Кол-во проб	Коэфф. коррел.	Пересечение
Набор реагентов «НЕРА-С-тест-Q», производства ООО «ТестГен» в сравнении с набором реагентов с набором реагентов «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, (регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00577 от 27.12.2019)	Плазма крови К2-ЭДТА человека	log10 МЕ/мл	ДТпрайм	48	0,9959	-0,061
			CFX 96	48	0,9956	-0,0055
			Rotor-Gene Q	48	0,9952	0,0322
			Quant Studio 5	48	0,9941	-0,0292

Полученные данные позволяют сделать вывод о достоверности результатов количественного определения концентрации РНК HCV в клинических образцах, полученных

с помощью испытуемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления РНК вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-С-тест-Q», производства ООО «ТестГен» и набора сравнения «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, (регистрационное удостоверение № ФСЗ 2007/00577 от 27.12.2019) при проведении ПЦР-анализа с использованием амплификаторов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/10228 от 03 марта 2011 г.;

- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2008/03399 от 21 июня 2016 года;

- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010;

- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США), регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8446 от 06 июня 2019 года.

Систематическая погрешность измерения логарифма концентрации РНК HCV не превышает: для амплификатора ДТпрайм: $\pm 0,09 \log_{10}$ МЕ/мл, для амплификатора CFX 96: $\pm 0,08 \log_{10}$ МЕ/мл, для амплификатора Rotor-Gene Q: $\pm 0,07 \log_{10}$ МЕ/мл, для амплификатора QuantStudio 5: $\pm 0,09 \log_{10}$ МЕ/мл.

4.3.7 Определение сходимости (клинические образцы)

Сходимость (внутрисерийная воспроизводимость) испытуемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления РНК вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-С-тест-Q» оценивалась посредством 10-кратного измерения двух образцов плазмы крови К2-ЭДТА человека с установленной концентрацией РНК HCV из линейного диапазона измерения, с помощью зарегистрированного набора реагентов «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, (регистрационное удостоверение № ФСЗ 2007/00577 от 27.12.2019) на амплификаторе Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия, № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010).

Значения концентраций рассматривали как имеющие лог-нормальное распределение и анализировали выраженными в $\log_{10}$.

Оценивались среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации. Сходимость считалась приемлемой, если

коэффициент вариации не противоречил данным технической документации. лабораториях, разными операторами, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах.

Коэффициент вариации (КВ) при определении сходимости результатов измерений РНК HCV в образцах плазмы крови ЭДТА человека, при помощи испытуемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления РНК вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-С-тест-Q», не превышает заявленной производителем и составляет не более 3%.

4.3.8 Определение сходимости (калибровочные образцы КО-1 и КО-2)

Сходимость (внутрисерийная воспроизводимость) калибровочных образцов в составе испытуемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления РНК вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-С-тест-Q» оценивалась посредством 10-кратного измерения каждого уровня калибровочных образцов КО-1 и КО-2 в одной аналитической серии.

Полученные результаты свидетельствуют об адекватности работы аналитической системы. По полученным результатам можно заключить, что коэффициент вариации (КВ) при определении сходимости результатов калибровочных образцов двух уровней КО-1 и КО-2 не превышает заявленной производителем и составляет более 3 %.

4.3.9 Определение воспроизводимости (калибровочные образцы КО-1 и КО-2)

Воспроизводимость калибровочных образцов КО-1 и КО-2 в составе испытуемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления РНК вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-С-тест-Q» оценивалась посредством измерений каждого уровня калибровочных образцов КО-1 и КО-2 в 10 дополнительных аналитических сериях.

Данные по воспроизводимости получают при тестировании различных партий набора реагентов, реакции ставят в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах.

Полученные результаты свидетельствуют об адекватности работы аналитической системы в условиях воспроизводимости: при тестировании различных партий набора реагентов, в разных

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 РНК содержимым из пробирки ПКО или продуктами амплификации;
4. Проведение анализа с использованием пробы РНК 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 реагентов по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для количественного выявления РНК вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-С-тест-Q» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 3, соответствующий 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 наборов реагентов «НЕРА-С-тест-Q», относятся к 4 классу опасных (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «СС. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности». При работе всегда следует выполнять следующие требования:

Реагенты, входящие в набор «НЕРА-С-тест-Q», обладающие низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «НЕРА-С-тест-Q», не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работу с материалом, заражённым или подозрительным на заражённость, проводят в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (МУ 1.3.3118-13), МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдение персоналом правил 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 клинических материалов с соблюдением санитарно-эпидемиологических 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 287-11) 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:

- удалять 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»;

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок 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 (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 или реализации изделия не предусмотрены.

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

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

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Вортекс;
3. Дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объёмы жидкости 20–200 мкл, 200–1000 мкл
4. Холодильник от 2 °С до 8 °С с морозильной камерой выше минус 16 °С;
5. Амплификатор³ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green и HEX/Yellow: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм», (ООО «НПО РНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 100 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, Ахуген, США);
2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» 1,5 или 2,0 мл;
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) и оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенки).

³ 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.

пробирки) для ПЦР: пробирки для ПЦР объёмом 0,1 или 0,2 мл⁴, или пробирки для ПЦР объёмом 0,1 или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, Ахуген, США), совместимые с используемым амплификатором;

4. Халат и одноразовые перчатки без талька;
5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;
6. Штативы «рабочее место» для пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл;
7. Набор для выделения НК из плазмы крови (см. п. 8.2 Инструкции).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для исследования являются пробы РНК, выделенные из плазмы крови К2-ЭДТА человека.

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, объёмом 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, находящихся на антикоагулянтной терапии, может привести к

⁴ Убедитесь в совместимости пробирок для ПЦР с используемым амплификатором.

получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови у таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

Условия транспортирования и хранения исходного клинического материала – крови:

- при температуре от +2 °С до +8 °С – 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 с кровью центрифугируют при 800–1600 g в течение 20 минут при комнатной температуре. После центрифугирования верхнюю фракцию (плазму) перенести в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 или 2,0 мл, свободную от РНКаз.

Условия транспортирования и хранения плазмы крови:

Допускается хранение плазмы при температуре от +2 °С до +8 °С до 5 суток, при температуре от -18 °С до -22 °С – до 12 месяцев, при температуре -70 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов плазмы.

Для выделения РНК использовать не менее 100 мкл плазмы. Повышение аналитической чувствительности набора возможно благодаря использованию большего объёма плазмы, если это предусмотрено используемым набором для выделения РНК.

Предварительная обработка материала

Подготовка не требуется.

Учёт, хранение, передача и транспортирование клинического материала, подозрительного на наличие вируса гепатитов, должно 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 учёта, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов IV групп патогенности.

Утилизация клинического материала (класс В), чрезвычайно эпидемиологически опасных отходов, осуществляется в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

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

Для выделения пробы РНК человека из плазмы крови 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).

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

К объёму плазмы, предназначенной для выделения РНК, следует добавить 10 мкл ВКО из набора реагентов «НЕРА-С-тест-Q».

Через этап выделения с добавлением 10 мкл ВКО проходят также ОКО и калибровочные образцы КО-1 и КО-2 в объёме 100 мкл. Если инструкцией производителя наборов реагентов для выделения РНК предусмотрено использование большего объёма образца, следует довести объём ОКО, КО-1 и КО-2 до требуемого физиологическим раствором или ТЕ-буфером.

Условия возможного хранения анализируемых образцов РНК:

- 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-С-тест-Q» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «НЕРА-С-тест-Q», 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 ДНК;

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

Исследованные концентрации интерферирующих веществ приведены в таблице 6.

Таблица 6

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 вирусном гепатите С	
Интерферон альфа	1000 МЕ/мл
Пегилированный интерферон альфа	0,036 мкг/мл
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

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.

Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия клинического материала.

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 РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «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. Перед проведением исследования необходимо разморозить компоненты набора при комнатной температуре.

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа РНК, ПЦР-буфером, смесью олигонуклеотидов, КО-1, КО-2, ОКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз и 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) объемом 0,1 или 0,2 мл для ПЦР из расчета: количество исследуемых образцов $\times$ 1 + 1 $\times$ ПКО + 1 $\times$ ОКО + 3 $\times$ КО-1 + 3 $\times$ КО-2.

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 продуктов амплификации в режиме реального времени;

3. Интерпретация результатов.

А) Подготовка ОТ-ПЦР

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

Общий объем реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объем реакции.

Для приготовления реакционной смеси на 1 реакцию необходимо:

1. ПЦР-буфер – 5 мкл,
2. Смесь олигонуклеотидов – 15 мкл,
3. Образец (исследуемый образец РНК, ПКО, ОКО) – 5 мкл.

⁵ Для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

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

2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: $(n+9) \times 5$ мкл ПЦР-буфера и $(n+9) \times 15$ 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 РНК. В пробирки для ПКО и ОКО препарат РНК не вносится.

5. В соответствующие пробирки для КО-1 и КО-2 добавить по 5 мкл калибровочных образцов, прошедших через этап выделения РНК (см. п. 8.2).

6. Внести в соответствующую пробирку 5 мкл ПКО.

7. Внести в соответствующую пробирку 5 мкл ОКО, прошедших через этап выделения РНК (см. п. 8.2).

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

Б) Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация РНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации 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 по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Тип анализа: количественный со стандартами. Протокол ПЦР указан в таблице 7.

3. Указать количество и идентификаторы образцов, стандартов КО-1 и КО-2 с указанием их концентратов, отметить

пробирок на матрице термоблока в соответствии с

Удостовериться, что в параметрах оптических измерений
ммы амплификации задействованы каналы детекции
/Green и HEX/Yellow.

5. Запустить ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

6. По окончании выполнения программы приступить к
анализу результатов.

Таблица 7 – 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	
	67	00:30	–	

11. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят по завершении 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 5–20% от максимального уровня
флуоресценции, полученного для положительного контрольного
образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям
каналов FAM/Green и HEX/Yellow (табл. 1). Учитываются только
значения Ct, полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной
детекцией (то есть соответствующие стадии 4 – см. табл. 7).

Сначала оценивают прохождение реакции и значения Ct 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. 8).

Таблица 8 – Результаты исследования для ОКО и ПКО

Контрольный образец	Значения Ct по каналам детекции, соответствующим флуорофорам	
	FAM/Green	HEX/Yellow
ОКО	> 35 или отсутствует	≤ 32
ПКО	≤ 30	≤ 30

При получении для ОКО значений, отличающихся от
указанных в таблице 8, 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 8, требуется повторная постановка
амплификации всей партии образцов. При повторном получении для
ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 8,
необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

Интерпретация результатов проводится автоматически с
помощью программного обеспечения, поставляемого вместе с
используемым детектирующим амплификатором, или вручную.

На основании полученных значений Ct для калибровочных
образцов и их концентраций необходимо произвести построение
калибровочной прямой. При использовании калибровочной прямой

производится вычисление концентраций анализируемых образцов. Для образцов учитываются значения $Ct \leq 35$ по каналу FAM. При получении для образцов значения $Ct > 35$ (при значении Ct у ВКО ≤ 32), результат считается сомнительным.

Эффективность ПЦР должна быть более 90%, разница между значениями Ct у повторов каждого калибровочного образца, КО-1 и КО-2, должна быть не более 1. В противном случае необходимо заново провести анализ, начиная с этапа выделения РНК. В случае если один из трёх дублей КО-1 или КО-2 имеет резко отклоняющееся от остальных значение Ct , допускается его игнорирование при построении калибровочной прямой.

Если для экстракции РНК использовался объём плазмы, превышающий 100 мкл (при сохранении объёма калибровочных образцов, взятых для выделения РНК), следует произвести пересчёт полученной концентрации РНК гепатита С: умножить полученное значение концентрации на соотношение $100/V$, где V – используемый объём плазмы для выделения РНК. Точность измерений: $\pm 0,4$ lg концентрации.

Дальнейшие принципы интерпретации результатов отражены в таблице 9.

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

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

Таблица 9 – Принцип интерпретации результатов в исследуемых клинических образцах

Каналы, соответствующие флуорофорам		Интерпретация результата
FAM/Green (HCV), ME/мл	HEX/Yellow (ВКО), Ct	
$145 - 1,89 \cdot 10^7$ ME/мл	не уч.	положительный результат с указанием конкретной концентрации в ME/мл
< 145 ME/мл	не уч.	положительный результат с указанием «менее 145 ME/мл»
$> 1,89 \cdot 10^7$ ME/мл	не уч.	положительный результат с указанием «более $1,89 \cdot 10^7$ ME/мл»
–	≤ 32	отрицательный результат (концентрация не указана)
–	–	невалидный результат

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

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

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

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

Набор реагентов «НЕРА-С-тест-Q» 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 «НЕРА-С-тест-Q» не более 10 раз.

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

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

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов «НЕРА-С-тест-Q» следует транспортом 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 в течение всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования подготовленными холодоэлементами. Тип, объём и количество холодоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами 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 «НЕРА-С-тест-Q» – 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 п. 170 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 многоразовые емкости или одноразовые пакеты 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 «НЕРА-С-тест-Q» 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 и безопасность набора реагентов «НЕРА-С-тест-Q» в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования и хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов 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 13
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 количественного выявления РНК вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-С-тест-Q» 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

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

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

43 (Сорок три) листов

Должность: ген. директор
Тороповский А.Н.

