

УТВЕРЖДАЮ»

Общество с ограниченной
ответственностью «ROSSA»

Я.И.Тян
«3» июля 2024



**Инструкция по применению медицинского изделия
для диагностики in vitro**

**Набор реагентов «ROSSAmed HBV/HCV/HIV-1» для одновременного
выявления ДНК вируса гепатита В (HBV), РНК вируса гепатита С (HCV),
РНК вируса иммунодефицита человека (HIV-1) методом real-time PCR»,
производства ООО «ROSSA», Узбекистан**

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов «ROSSAmed HBV/HCV/HIV-1» для одновременного выявления ДНК вируса гепатита В (HBV), РНК вируса гепатита С (HCV), РНК вируса иммунодефицита человека (HIV-1) методом real-time PCR

Назначение

Набор реагентов «ROSSAmed HBV/HCV/HIV-1» предназначен для диагностики IN VITRO. Применяется для качественного выявления ДНК вируса гепатита В (HBV), РНК вируса гепатита С (HCV) и РНК вируса иммунодефицита человека 1-го типа (HIV-1) методом ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени». Материалом для проведения ПЦР служат пробы РНК ДНК, выделенные из плазмы (EDTA K2/ EDTA K3)/сыворотки крови.

Область применения

IN VITRO диагностика

Характеристика

Диагностическая чувствительность - 100%,

Диагностическая специфичность – 100%

Оценка аналитической специфичности набора реагентов

проведена посредством добавления в реакцию геномной ДНК/РНК следующих организмов и вирусов: цитомегаловирус, вирус герпеса человека 1/2 типа, вирус гепатита D, вирус эпштейна-барра (ebv). Перекрестные реакции для указанных организмов и вирусов зарегистрированы не были.

Среднее время проведения анализа – от 130 минут.

Набор реагентов содержит в составе фермент урацил-ДНК-гликозидазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР смеси продуктами предыдущих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

Комплектация набора «ROSSAmed HBV/HCV/HIV-1» рассчитана на проведение 100 реакций, включая контрольные образцы.

Принцип метода

Метод основан на тестировании образцов РНК/ДНК, выделенных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом, для проведения обратной транскрипции РНК с последующей амплификацией синтезированных фрагментов кДНК и ДНК методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени». Выявление ДНК вируса гепатита В, РНК вируса гепатита С и РНК вируса иммунодефицита человека 1-го типа с детекцией результатов в режиме «реального времени» основан на использовании процесса амплификации кДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей этих праймеров Taq-полимеразой. В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (следовательно, и уровень флуоресценции) возрастает пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

На стадии выделения РНК в реакционную смесь добавляют внутренний контрольный образец (ВКО), предназначенный для оценки эффективности всех этапов исследования. В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации ВКО, включена флуоресцентная метка FAM для оценки амплификации в режиме «реального времени».

Состав набора реагентов

1. ОТ(обратная транскрипция)-ПЦР-реагент	1 пробирка – 1,0 мл
2. Праймер микс	1 пробирка – 1,0 мл
3. ПКО (Положительный контрольный образец)	1 пробирка – 0,2 мл
4. ОКО (Отрицательный контрольный образец)	1 пробирка – 1,0 мл
5. ВКО (Внутренний контрольный образец)	1 пробирка – 1,0 мл

Меры предосторожности

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории.

Условия окружающей среды в лаборатории необходимые при работе с набором реагентов:

-температура от 20 до 28 °С;

-относительная влажность 15-75%.

Подготовку и проведение исследования с использованием набора реагентов следует выполнять в ПЦР-боксах.

Дозаторы, используемые при работе с набором, должны быть соответствующим образом проверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение одного часа.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

При использовании набора в диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН № 0317-15.

При использовании набора реагентов согласно инструкции и соблюдения мер предосторожности при работе в лаборатории набор безопасен.

Ограничения на применение

! Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортировки и хранения;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечении срока годности набора;
- не использовать набор для других целей, кроме как для диагностики *in vitro*;
- набор может быть использован только в качестве вспомогательного диагностического средства для выявления РНК HCV.

! При работе необходимо использовать одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free»

При подготовке исследуемого материала к экстракции! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

Интерферирующие вещества

Потенциально интерферирующие эндогенные вещества: билирубин, триглицериды, альбумин, креатинин в концентрациях:

Билирубин – 1,7-20,5 мкмоль/л.

Триглицериды – 0,4-2,42 ммоль/л

Альбумин – 34-51 г/л.

Креатинин – 44,0-97,0 мкмоль/л

не оказывают влияния на результаты ПЦР анализа с использованием набора реагентов ROSSamed HBV/HCV/HIV-1

Оборудование и материалы

- амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени» («Bio-Rad CFX96», приборы серии ДТ или аналогичные.);
- ПЦР-бокс/ламинарный бокс;
- центрифуга/вортекс типа MICROSPIN FV-2400;
- набор дозаторов переменного объема (до 10 мкл, до 200 мкл, до 1000 мкл);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема (10 мкл, 200 мкл, 1000 мкл);
- пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл;
- оптические пробирки или стрипы для ПЦР 0.2 мл;
- соответствующие штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

При использовании набора реагентов согласно инструкции и соблюдения мер предосторожности при работе в лаборатории набор безопасен.

Взятие, транспортировка и хранение исследуемого материала

- Для проведения анализа используется плазма и сыворотка периферической крови.

Рекомендовано для получения плазмы использовать в качестве антикоагулянта EDTA-K2, EDTA-K3.

Для получения сыворотки рекомендовано использовать пробирку без напыления или пробирку с активатором свёртывания. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму/сыворотку и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 15 мин при 1500 g.

- Материал образца следует перевозить в ударопрочном транспортном контейнере, чтобы избежать потенциального риска инфицирования из-за утечки образца. Образцы необходимо транспортировать согласно местным и национальным инструкциям по перевозке инфекционного материала. Не рекомендуется хранить образцы в том месте, в котором они были собраны. После сбора образцы следует отправлять в место проведения исследования в течение 6 часов.

Транспортировку образцов крови необходимо производить в охлаждённом состоянии (2-8°C), а сепарированную плазму в глубокой заморозке (от -24 до -16°C).

- Хранить плазму/сыворотку рекомендовано не более 3 суток при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 70°С.

Образцы плазмы непосредственно перед выделением РНК центрифугировать при 13 000 g в течении 5 минут, для выделения РНК использовать 100 мкл надосадочной жидкости.

Проведение анализа

Выделение РНК/ДНК

Выделение производится в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя набора для выделения РНК/ДНК. Рекомендуемый комплект для выделения РНК/ДНК из биологического материала «MagSorb Plasma» (Производства компании ООО «ROSSA»).

! Добавить 10 мкл ВКО в каждую пробирку на этапе выделения в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя набора для выделения.

Подготовка ПЦР-смеси

1. Разморозить все реагенты при комнатной температуре, перемешать на вортексе и осадить капли со стенок и крышек пробирок с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Приготовить необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл. В каждую постановку амплификации, помимо исследуемых образцов, должны входить контрольные образцы: отрицательный контроль ПЦР (ОКО), положительный контроль ПЦР (ПКО), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).
3. В пробирке объемом 1,5 мл приготовить «Мастер-микс» по формуле:
10 ×(N+1) мкл ОТ-ПЦР-реагента и 10 ×(N+1) мкл Праймер микс;
где N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.
Перемешать «Мастер микс» на вортексе и осадить капли со стенок и крышек пробирок с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Внести по 20 мкл Мастер-микса в подготовленные пробирки для проведения ПЦР.
5. Добавить по 30 мкл РНК/ДНК исследуемых образцов, в пробирку К- внести 30 мкл ОКО, в пробирку К+ 30 мкл ПКО, в пробирку ОКЭ внести 30 мкл ОКЭ.
6. Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок, удалить кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

1. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.
2. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно **таблице 2.**
3. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать расположение пробирок в амплификаторе, запустить амплификацию и сохранить файл с результатами эксперимента.

Таблица 2. Параметры амплификации

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Обратная транскрипция	55	10 мин	1
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Элонгация/Детекция по каналам FAM, HEX	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	

Анализ результатов

! Результат амплификации внутреннего контрольного образца регистрируется по каналу FAM, результат амплификации РНК/ДНК возбудителя регистрируется по каналу флуоресценции HEX/ROX/Cy5.

1. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору, установить «Пороговый Метод (Ct)», при необходимости установить значение параметра пороговой линии, выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня (таблица 5). Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).
2. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.
3. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	Значение «Ct» по каналу «FAM» (Внутренний контрольный образец)	Значение «Ct» по каналам «HEX/ROX/Cy5» (РНК/ДНК возбудителя)
ОКЭ*	≤30	–
К-**	–	–
К+	≤30	+

*В случае несоответствия контрольной точки ОКЭ необходимо провести повторное исследование всех положительных образцов, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК.

**В случае несоответствия контрольных точек К- необходимо провести повторное исследование всех образцов, начиная с этапа амплификации.

Таблица 4. Интерпретация результатов анализа

Результат образца	Значение «Ct» по каналу «FAM» ВКО	Значение «Ct» по каналу «ROX» HSV	Значение «Ct» по каналу «Cy5» HCV	Значение «Ct» по каналу «HEX» HIV-1
Положительный	+/-	+	+	+
Отрицательный	≤30	–	–	–
Не валидный*	–/≥30	–	–	–

«–» - значения «Ct» отсутствуют, график амплификации не пересекает пороговую линию;

«+» - наличие значения «Ct», график амплификации пересекает пороговую линию;

«+/-» - значение «Ct» для данного канала не анализируется;

*В случае не валидного результата требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа взятия биологического материала.

! Рекомендации по настройкам при программировании и анализе результатов для ПЦР амплификаторов при работе с наборами регентов ООО «ROSSA»

Для приборов серии «ДТ»

1. Выбрать «Метод: Пороговый (Ct)».
2. Выбрать необходимые каналы детекции флуоресценции.
3. Для каждого канала установить значение пороговой линии, соответствующее 5% от максимального значения флуоресценции для образца ПКО в последнем цикле амплификации. В случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах выставить значение пороговой линии в диапазоне, соответствующем 0-30% от максимального значения флуоресценции для образца ПКО в последнем цикле амплификации.
4. Провести анализ и интерпретацию результатов.

Для приборов Biorad CFX96

1. Выбрать режим определения пороговых циклов: «Cq Determination Mode – Single Threshold».
2. Активировать «Apply Fluorescence Drift Correction» и «Baseline Subtracted Curva fit».
3. Для каждого канала установить значение пороговой линии, соответствующее 5% от максимального значения флуоресценции для образца ПКО в последнем цикле амплификации. В случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах выставить значение пороговой линии в диапазоне, соответствующем 0-30% от максимального значения флуоресценции для образца ПКО в последнем цикле амплификации.
4. Провести анализ и интерпретацию результатов.

Таблица 6. Проблемы при работе и методы их устранения

Проблема	Возможная причина	Варианты решения
Нет сигнала по всем каналам	Использование неподходящих расходных материалов	Используйте оптические пробирки для постановки ПЦР с прозрачными крышками, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора, либо адаптированные для используемого прибора
	ПЦР ингибирование	Разведите образец в 5 раз в воде, повторите анализ
		Повторите ПЦР-анализ, начиная с этапа взятия биологического материала.
Нет сигнала в К+	Некорректное приготовление ПЦР- смеси	Аккуратно приготовьте новую ПЦР-смесь

	Некорректные параметры амплификации	Установите параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	Используйте наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала по каналу по каналам «HEX/ROX/Cy5» в К-и/или ОКЭ	Контаминация	Проведите деконтаминационные процедуры

Транспортировка

Транспортировку набора реагентов рекомендуется осуществлять при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. Допускается транспортировка при температуре от 2 °С до 8 °С, не более 3 суток любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих сохранность наборов, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

Гарантийные обязательства

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Хранение

Компоненты набора реагентов хранят в упаковке изготовителя при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С.

Хранение после вскрытия

После вскрытия набор реагентов хранят при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. Допускается заморозка/оттаивание компонентов не более 10 раз.

Срок годности

12 месяцев с даты изготовления, при соблюдении условий хранения набора реагентов.

Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность в связи с истечением срока годности или повреждением упаковки подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Набор реагентов предназначен для одноразового использования согласно указанному количеству реакций (см. пункт «Назначение и характеристика»).

Производитель

ООО «ROSSA», Узбекистан, Ташкентская область, г. Нурафшан, посёлок Дегантепа, улица Рохат, дом 93

Tel.: +998 70 202 60 60

<https://rossa.uz/>

Компаний ООО «ROSSA» успешно прошла процедуру подтверждения на соответствие стандартам ISO 9001:2015 и ISO 13485:2016 международного образца

Служба поддержки клиентов: +998 99 353 37 87

Представитель производителя в РФ: Общество с ограниченной ответственностью «БИОНЕР ТЕХ», 127018, г. Москва, вн.тер.г.Муниципальный округ Марьино Роща, ул. Суцевский Вал, д.49, помещ. 410

На упаковке и этикетках могут присутствовать следующие обозначения:

	Номер партии
	Дата производства
	Использовать до
	Ограничение по температуре
	Смотрите инструкции по применению
	Производитель
	Хрупкое, обращаться осторожно
	Не допускать воздействия солнечного света
	Медицинское изделие для диагностики in vitro

Применяемые национальные стандарты.

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 ISO 14971-2021 «Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям»;

ГОСТ Р EN 13612-2010 «Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro»;

ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний»;

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 15223-1-2020 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации.

Часть 1. Основные требования»;

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro».

ГОСТ Р EN 13641-2010 «Устранение или снижение риска инфицирования, связанного с реагентами для диагностики in vitro».

Редакция, версия (1.3)

Переведено с узбекского языка

Круглая печать:

Внутри большого круга:

Республика Узбекистан Ташкентская область

Общество с ограниченной ответственностью

Внутри малого круга:

ROSSA

),
,

Республика Узбекистан. Город Ташкент.

Данный документ переведён на русский язык мной – **Умуркуловой Дилфузой Муминовной** (паспорт АВ № 0022496, выдан 11.06.2015 г. Бешарыкским РОВД Ферганской области, владелец диплома Узбекского Государственного Университета Мировых Языков, серии М № 015671 выданного 11.07.2006 года).

До перевода настоящего документа я была предупреждена об ответственности за ложный (неправильный) перевод.

Переводчик не несет ответственности за содержание и достоверность информации в изложенном оригинале документа.

ПОДПИСЬ *Умуркулова Д.М.*

За дополнительной информацией обращайтесь по тел: +99895 884-94-94

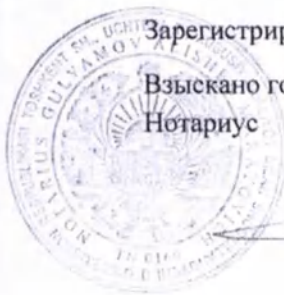
Республика Узбекистан, город Ташкент.

26 ИЮН 2024

Две тысячи двадцать четвертого года

Я, **ГУЛЯМОВ АЛИШЕР МАРАТОВИЧ**, нотариус Учтепинского района города Ташкента, занимающийся частной практикой, свидетельствую подлинность подписи известного мне переводчика **Умуркуловой Дилфузы Муминовны**. Личность **Умуркуловой Дилфузы Муминовны** установлена, дееспособность проверена, т.е. при личном общении с ней её дееспособность сомнений не вызвала. На день совершения данного нотариального действия сведений о её недееспособности не имеется.

На основании статьи 67 «Закона о нотариате» Республики Узбекистан, Нотариус, свидетельствуя подлинность подписи, не удостоверяет факты, изложенные в документе, а лишь подтверждает, что подпись сделана определенным лицом.



Зарегистрировано в АИС «НОТАРИУС» за № 20240221902 8628

Взыскано государственной пошлины 17 000 (семнадцать тысяч) сум

Нотариус

ГУЛЯМОВ А.М.



Гербовая печать нотариуса:

Внутри большого круга:

Республика Узбекистан

Город Ташкент, Учтепинский район

ГУЛЯМОВ АЛИШЕР МАРАТОВИЧ

Нотариус, занимающийся частной практикой

Внутри маленького круга:

Герб Республики Узбекистан

(Все гербовые печати нотариуса являются идентичными)

Печать:

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ «ROSSA»

ТАШКЕНТСКАЯ ОБЛАСТЬ РЕСПУБЛИКА УЗБЕКИСТАН

**Инструкция по применению медицинского изделия
для диагностики in vitro**

/текст на русском языке/

Гербовая печать:

**НОТАРИУС, ЗАНИМАЮЩИЙСЯ ЧАСТНОЙ ПРАКТИКОЙ ГУЛЯМОВ АЛИШЕР
МАРАТОВИЧ, УЧТЕПИНСКИЙ РАЙОН, ГОРОД ТАШКЕНТ, РЕСПУБЛИКА УЗБЕКИСТАН *
TN 0169 * /Герб Республики Узбекистан/**

Гербовая печать:

**НОТАРИУС, ЗАНИМАЮЩИЙСЯ ЧАСТНОЙ ПРАКТИКОЙ ГУЛЯМОВ АЛИШЕР
МАРАТОВИЧ, УЧТЕПИНСКИЙ РАЙОН, ГОРОД ТАШКЕНТ, РЕСПУБЛИКА УЗБЕКИСТАН *
TN 0169 * /Герб Республики Узбекистан/**

Перевод данного текста с узбекского языка на русский язык сделан мной, переводчиком
Тумановым Владимиром Олеговичем.



Российская Федерация

Город Москва

Первого июля две тысячи двадцать четвертого года.

Я, Акимов Глеб Борисович, нотариус города Москвы, свидетельствую
подлинность подписи переводчика Туманова Владимира Олеговича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре № 77/09-н/77-2024- 42-442

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.



Г.Б. Акимов

Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью 11 лист(а)(ов)

Нотариус