

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «ЭКОлаб»

Т.Ю. Гашенко

«25» 04 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Набор реагентов «ГепатЭК С» для качественного выявления РНК вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ГепатЭК С» для качественного выявления РНК вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени предназначен для качественного выявления РНК вируса гепатита С (HCV) в пробах нуклеиновых кислот (НК), выделенных из клинических образцов плазмы (с К₂ЭДТА) крови человека, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Функциональное назначение: набор реагентов «ГепатЭК С» предназначен для диагностики вирусного гепатита С.

Набор предназначен для обследования всех групп населения любого возраста без градации по демографическому или популяционному признаку.

Полученные результаты не являются основанием для постановки диагноза, а используются только в сочетании с другими лабораторными показателями и диагностической информацией.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики *in vitro*.

Потенциальные потребители изделия

Набор реагентов предназначен только для профессионального использования в медицинских и научно-исследовательских учреждениях, работа лабораторий которых обеспечена в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Для работы с набором реагентов сотрудники лаборатории должны иметь среднее или высшее образование (медицинское, биологическое), прошедшие обучение в аккредитованных организациях по вопросам обеспечения безопасности при работе с микроорганизмами II-IV групп патогенности и курсы повышения квалификации по молекулярно-биологической диагностике.

Показания к применению изделия.

Применение набора реагентов «ГепатЭК С» показано: в клинической лабораторной диагностике для выявления носительства вирусного гепатита С, а также для контрольных исследований во время и после проведенного лечения.

Противопоказания

Противопоказаниями к использованию набора реагентов являются:

- истекший срок годности набора реагентов
- нарушение внутренней упаковки компонентов набора
- несоответствие внешнего вида компонентов их описанию в инструкции
- ненадлежащие условия хранения и/или транспортирования набора реагентов

Другие противопоказания, при использовании набора реагентов специально обученным персоналом в строгом соответствии с требованиями инструкции по применению, отсутствуют.

Возможные побочные действия

При использовании медицинского изделия по инструкции по применению побочные действия не выявлены.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Вирус гепатита С

Гепатит С — это инфекционное заболевание, вызываемое вирусом гепатита С (HCV), которое в первую очередь поражает клетки печени - гепатоциты. Вирус сохраняется в печени примерно у 75-85% первично инфицированных. На ранних стадиях хроническая инфекция обычно не имеет симптомов. Далее, распространение инфекции приводит к заболеваниям печени и, в конечном итоге, к циррозу или раку печени.

Вирус гепатита С относится к семейству *Flaviviridae*, роду *Hepacivirus*. Вид – *Hepatitis C virus* (HCV). Так же вирус гепатита С обнаружен у летучих мышей, грызунов, собак и человека, однако ВГС поражает только людей и шимпанзе.

Внутри вида вирус гепатита С подразделяется на генотипы. На сегодняшний день выделяют 6 генотипов вируса гепатита С. Генотипы 1 и 4 менее чувствительны к лечению интерфероном, чем другие генотипы (2, 3, 5 и 6). Заражение одним генотипом не дает иммунитета против других, возможно одновременное заражение двумя штаммами. В большинстве этих случаев один из штаммов побеждает другой за короткое время. В европейской части России преобладают 1b и 3a генотипы.

Вирус гепатита С преимущественно передается через кровь с очень низким риском половой или вертикальной передачи. Довольно часто вирусный гепатит С передается внутрибольнично. Также ВГС может передаваться от инфицированной матери к ребенку во время родов, однако вирус не передается при поверхностном контакте.

Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени определяется наличие генетического материала вируса и его количество (вирусная нагрузка) в образце крови. Определение РНК вируса гепатита С совместно с клинической картиной заболевания и биохимическими показателями, маркерами инфекции, а также результатом пункционной биопсии печени позволяет дать прогноз заболевания и оценить необходимость противовирусной терапии.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Набор реагентов «ГепАЭК С» выпускается в двух формах (Форма 1 и Форма 2 с планшетом для ПЦР и пленкой для ПЦР-планшета.)

Наименование компонента	Характеристика компонента	Количество компонента	
		Форма 1	Форма 2
Смесь 1 (С)	Прозрачная жидкость без посторонних включений	1 пробирка (0,5 мл)	1 пробирка (0,5 мл)
Смесь 2	Прозрачная жидкость без посторонних включений	1 пробирка (1,5 мл)	1 пробирка (1,5 мл)
Положительный контрольный образец (ПКО-С)	Прозрачная жидкость без посторонних включений	1 пробирка (0,2 мл)	1 пробирка (0,2 мл)
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная жидкость без посторонних включений	1 пробирка (1,0 мл)	1 пробирка (1,0 мл)
Планшет для ПЦР	Планшет на 96-лунок, стандартного профиля для проведения ПЦР	-	1 шт.
Пленка для ПЦР-планшета	Клейкая, с силиконовыми капсулами для планшета для проведения ПЦР в режиме реального времени	-	1 шт.
Инструкция по применению		1 шт.	1 шт.

Примечания:

- 1) В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).
- 2) В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Каждая форма набора реагентов «ГепатЭК С» рассчитана на проведение исследования 96 образцов, включая контрольные.

Методы стерилизации изделия

Изделие не требует стерилизации.

Программное обеспечение работы изделия

Отсутствует.

Техническое обслуживание и ремонт изделия

Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Выявление микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя амплификацию фрагмента РНК данного микроорганизма и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. При выявлении РНК вируса гепатита С принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК с последующей амплификацией к ДНК данного вируса.

Проводится реакция амплификации фрагмента РНК выявляемого микроорганизма при помощи специфичных к нему праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой РНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. К олигонуклеотидным зондам, специфичным к различным РНК-мишеням, прикреплены различные флуоресцентные метки. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации каждой РНК-мишени путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по соответствующему каналу.

По каналу, соответствующему флуорофору ROX/Orange детектируется продукт амплификации РНК ВГС. Положительный контрольный образец (ПКО-С) детектируется по каналам FAM/Green (ВКО) и ROX/Orange (ВГС).

Детекция результатов ПЦР осуществляется без извлечения продуктов реакции из пробирок, что позволяет свести к минимуму риск контаминации продуктами ПЦР.

Внутренний контроль образец (ВКО) в данном наборе является эндогенным и представляет собой ген бета-глобулина человека. Детекция ВКО в ходе реакции амплификации свидетельствует о наличии гена в исследуемом образце клинического материала.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Материалом для исследований служат образцы плазмы (с К₂ЭДТА) крови человека, из которых выделяются препараты нуклеиновых кислот (НК) для последующего исследования в ПЦР. Объем анализируемого образца для ОТ-ПЦР составляет 5 мкл.

Объем плазмы крови (с К₂ЭДТА) для экстракции НК составляет не менее 100 мкл.

Все образцы, собранные для лабораторных исследований, должны рассматриваться как потенциально инфекционные, и медицинский персонал, который собирает или перевозит клинические образцы, должен строго соблюдать требования биологической безопасности как при работе с микроорганизмами II-IV группы патогенности.

Перевозка образцов должна осуществляться в соответствии с требованиями санитарного законодательства по отношению к микроорганизмам II-IV группы патогенности в специальном контейнере с охлаждающими элементами.

Отбор проб, упаковку и транспортирование осуществляют в соответствии с СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Для проведения ПЦР-исследования используется плазма периферической крови человека. Взятие крови проводится утром натощак в пробирку с раствором (K₂ЭДТА) в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g. Хранить плазму можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

После завершения сбора образцов от больного (больных) все инструменты и подсобные материалы, а также использованные средства индивидуальной защиты (перчатки, халат и пр.) дезинфицируют согласно требованиям СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

Внимание! Следует рассматривать пробы клинического материала, как потенциально инфекционно-опасные.

Внимание! Пробы клинического материала, в отношении которых были выявлены нарушения требований данного раздела инструкции, считаются непригодными для исследования.

Условия хранения и транспортирования материала:

Транспортировать и хранить образцы необходимо при температуре:

от (18-25) °С – до 2 часов; при температуре (2-8) °С – не более суток; при температуре минус 20 °С – до двух недель.

Пробы клинического материала, хранившиеся в холодильнике/морозильнике, перед анализом прогреть до температуры (20 – 28) °С и аккуратно перемешать.

Избегать повторных циклов замораживания/оттаивания проб клинического материала.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Аналитическая чувствительность

Предел обнаружения РНК гепатита С (HCV) с использованием КОЧ (Контрольного образца чувствительности) составляет 250 МЕ/мл в 1 мл анализируемого образца в реакции ПЦР¹⁾. Набор реагентов выявляет следующие генотипы HCV: 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 2i, 3, 4, 5a, 6.

Аналитическая чувствительность набора реагентов «ГепАЭК С»

Вид материала	Набор для экстракции НК	Набор для амплификации	Предел обнаружения МЕ/мл		Диапазон измерений МЕ/мл	Анализируемый образец	Канал, соответствующий флуорофору	значение «Ст» по каналу
Плазма крови (с K ₂ ЭДТА)	Набор для экстракции НК, «РИБО-преп»	Набор реагентов «ГепАЭК С»	РНК Гепатита С (HCV)	250	от 20000 МЕ/мл до 20 МЕ/мл.	«КОЧ С (HCV) ГепАЭК»	ROX/Orange	≤ 35

Примечание:¹⁾ данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в СОП-ПО-30-15 порядок приготовления Контрольного образца чувствительности («КОЧ В (HCV) ГепАЭК» и «КОЧ С (HCV) ГепАЭК») и в инструкции по применению набора для экстракции РНК, например Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического

2. Аналитическая специфичность.

Аналитическая специфичность набора реагентов была определена посредством добавления в реакцию геномной ДНК/РНК следующих микроорганизмов и вирусов: вирус гепатита А, вирус гепатита D, вирус гепатита Е, вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса типы 1, 2, вирус ветряной оспы, вирус герпеса человека типы 6, 8, аденовирус типы 2, 3, 7, *Homo sapiens*

Перекрестно реагирующих микроорганизмов и вирусов обнаружено не было.

3. Влияние ингибирующих веществ

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта К ингибиторам ПЦР относятся следующие вещества: присутствие в образце лубриканты, тальк, местные лекарственные препараты.

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

При подозрении на наличие в образце большого количества ингибиторов ПЦР рекомендуется выбирать методы выделения РНК, позволяющие максимально удалить ингибиторы ПЦР из образца, не рекомендуется использовать экспресс-методы выделения РНК.

Содержание цельной крови, антибактериальных препаратов не влияет на результат анализа.

Материал	Активный компонент	Заключение
Антибиотики	Левифлоксацин 0,1 г/мл, Азитромицин 0,25 г/мл	Добавление интерферента до указанной концентрации не оказывает влияние на результат теста
Цельная кровь (до 5% по объёму)		
Гемоглобин 200 г/л Билирубин 20,5 мкмоль/л Триглицериды 2,25 ммоль/л		

Противовирусные препараты, назначаемые при вирусном гепатите С - Интерферон альфа 1000 МЕ/мл, Пегилированный интерферон альфа 0,036 мкг/мл – не оказывают влияния на результат анализа.

4. Воспроизводимость

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой стандартные образцы предприятия, содержащие НК вируса гепатита С с концентрацией 2000 МЕ/мл, в качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования и разных серий набора реагентов. Результаты представлены в таблице:

«Гепатит С»	Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
		Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Форма 1	Положительный	10	100	50	100
	Отрицательный	10	100	50	100
Форма 2	Положительный	10	100	50	100
	Отрицательный	10	100	50	100

Интрасерийная воспроизводимость – положительный образец – 10 из 10 = 100%, отрицательный образец – 10 из 10 = 100% для Формы 1 «ГепаЭК С»; для Формы 2 «ГепаЭК С»

Межсерийная воспроизводимость – положительный образец – 50 из 50 = 100%, отрицательный образец – 50 из 50 = 100% для Формы 1 «ГепаЭК С», для Формы 2 «ГепаЭК С»

5. Диагностические характеристики

Диагностическая чувствительность набора реагентов: 100% [99,96 % – 100%] (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность набора реагентов: 100% [99,97 % - 100%] (с доверительной вероятностью 95%).

Ограничения метода

При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с РНК, могут наблюдаться ложноотрицательные реакции.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н). При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские».

Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования СанПин 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней"; 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" и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе с набором реагентов необходимо обеспечить соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ для предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Требования к помещениям, оборудованию, расходным материалам.

Температура в помещениях лаборатории при проведении исследований должна быть от 24 до 28 °С, относительная влажность - от 15 до 75 %.

Исследования проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса.

Каждый этап анализа должен проводиться в специально выделенных рабочих зонах (помещениях). Лабораторный процесс должен быть однонаправленным (работу следует начинать в зоне (помещении) экстракции, продолжать в зонах (помещениях) амплификации и детекции).

Запрещается перемещать лабораторное оборудование, дозаторы, штативы, посуду, рабочую одежду, головные уборы и др. из одного помещения в другое.

Дозаторы и другое измерительное и дозирующее оборудование должны быть поверены и промаркированы.

Для манипуляций с набором реагентов, пробами клинического материала и анализируемыми образцами (пробами выделенной РНК) использовать одноразовые пробирки и наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером, одноразовые перчатки без талька.

Для каждой операции использовать новые наконечники с аэрозольным барьером.

Безопасность персонала

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПин 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

При работе использовать средства индивидуальной защиты (блузон, брюки, халат, шапочку, тапочки или сабо, очки защитные, полумаску, одноразовые неопудренные перчатки, нарукавники одноразовые). Тщательно вымыть руки по окончании работы.

Все реагенты, входящие в состав компонентов набора реагентов в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают.

Набор реагентов не содержит материалы биологического происхождения, вещества в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным и влияющим на репродуктивную функцию человека действием. При использовании по назначению и соблюдении всех предписанных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

Сведения о дезинфекции и утилизации

Все использованные материалы, инструменты и оборудование, рабочие поверхности дезинфицировать в соответствии с требованиями СанПин 3.3686-21 и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

Все поверхности в лаборатории ежедневно подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СанПин 3.3686-21.

Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

Токсичные отходы не образуются в процессе использования и утилизации набора реагентов с истекшим сроком годности.

Отходы, образующиеся в процессе использования и утилизации набора реагентов с истекшим сроком годности, относить к классу Б.

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.

Неиспользованные компоненты, компоненты с истекшим сроком годности, а также использованные компоненты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, отходы после амплификации следует удалять 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".

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы:

- бокс биологической безопасности II класса защиты по ГОСТ Р ЕН 12469-2010, (например, Бокс бактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С, " ЗАО "Ламинарные системы", Россия РУ № ФСР 2010/07114);
- амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»:
- «CFX96» - Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, ООО «Био-Рад Лаборатории», Россия, РУ № ФСЗ 2008/03399;
- «ДТпрайм» – Амплификатор детектирующий «ДТ прайм», ООО «НПО ДНК-Технология» Россия, РУ № ФСР 2011/10229;
- «QuantStudio 5» - Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени, «Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.», Сингапур, РУ № РЗН 2019/8446;
- «Rotor-Gene» – Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q, с принадлежностями, «КИАГЕН ГмбХ», Германия, РУ № ФСЗ 2010/07595;
- оптические пробирки для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики), адаптированные для используемого амплификатора (например, производитель "Сайентифик Спешиалтис Инкорпорейтед (ЭсЭсАй)", РУ №ФСЗ 2011/10287);

термостат для пробирок объемом 1,5 и/или 2 мл с возможностью термостатирования при 70°C (например, «Термит» с таймером ТТ-2, РУ № ФСР 2012/14090, производитель ООО «НПО ДНК-Технология» или подобный);

- микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5 и/или 2 мл со скоростью вращения не менее 12 000 об/мин (например, MiniSpin, Eppendorf, РУ № РЗН 2016/4617; IEC MicroCL 17, АО "Термо Фишер Сайентифик" РУ № ФСЗ 2008/01225);

- вортекс (например, вортекс персональный V-1 plus, РУ №ФСЗ 2011/09797, производитель SIA "Biosan");

-набор дозаторов пипеточных механических одноканальных с варьируемым объемом дозирования 1-10 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (например, производитель "Сарториус Биохит Ликвид Хендлинг Ой", РУ №РЗН 2019/9356; АО "Термо Фишер Сайентифик", ТУ 9443-007-33189998-2007, РУ ФСР 2007/01095);

- одноразовые наконечники с фильтрами (Filter ерT.I.P.S. PCR clean) для дозаторов (например, производитель "Эппендорф АГ", РУ №ФСЗ 2009/04520);

- одноразовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5–2,0 мл; (например, пробирки Safe-Lock PCR clean с защелкой, объемом от 0,5мл до 2,0мл (Safe-Lock PCR clean tubes 0,5-2,0ml), РУ №ФСЗ 2009/04520; производитель "Эппендорф АГ");

- холодильник от +2 °С до +8 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С (например, производитель АО "ПОЗиС", РУ №ФСР 2012/13773);

- отдельный халат и одноразовые перчатки;

- емкость для сброса наконечников (например, ЗАО "ПТП Киль", РУ №ФСР 2007/00917);

- штативы для пробирок и наконечников (например, производитель "Эппендорф АГ", РУ №ФСЗ 2009/04520);

- пробирка центрифужная типа Эппендорф из полипропилена, Россия, ООО «МиниМед», РУ № РЗН 2015/2596.

- комплект средств для обработки рабочего места.

Внимание! При работе с РНК необходимо использовать расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free».

1. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Производится выделение РНК в соответствии с Инструкцией по применению набора реагентов для экстракции.

Внимание! Для повышения чувствительности рекомендуется проводить выделение РНК из 250 мкл образца.

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

Выделение РНК вируса гепатита С (HCV) из образцов плазмы крови человека можно проводить с любым коммерческим набором (например, Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (Производитель ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, РУ № ФСР 2008/03147 от 06.08.2021) или любым коммерческим набором для экстракции согласно его инструкции по применению.

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

2.1 .ПОДГОТОВКА ПЦР-СМЕСИ

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать (перевернув пробирки несколько раз) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

1. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов (N) должны входить 2 контрольных образца: отрицательный контрольный образец (ОКО) и положительный контрольный образец (ПКО-С).

В пробирке объемом (1,5-2) мл приготовить «Мастер Микс»:

15× (N+1) мкл Смесь 2 + 5× (N+1) мкл Смесь 1,

где Смесь 1 – это Смесь 1 (С) для формы 1 или для формы 2.

N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

Перемешать «Мастер Микс» на вортесе 5 сек, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР (или лунки планшета)*.

III. В подготовленные пробирки (или лунки планшета)* добавить по 5 мкл экстрагированных РНК.

IV. Поставить контрольные реакции амплификации:

1) Отрицательный контрольный образец (ОКО) – внести в пробирку (или лунку планшета)* - 5 мкл ОКО;

2) Положительный контрольный образец (ПКО) – внести в пробирку (или лунку планшета)* - 5 мкл ПКО,

где ПКО – это (ПКО-С) для формы 1 или для формы 2.

Герметично закрыть пробирки крышками (или заклеить планшет сверху специальной пленкой для ПЦР-планшета)* В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием.

Примечание: для формы 2*

***При работе с формой 2 (с планшетом для ПЦР и пленкой для ПЦР- планшета)**

Для прибора «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология»):

1. Приготовление «Мастер Микс»

$15 \times (N+1)$ мкл Смесь 2 + $0,5 \times (N+1)$ мкл Смесь 1,

где Смесь 1 – это Смесь 1 (С) для формы 1 или для формы 2

N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

2. Перемешать «Мастер Микс» на вортесе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл «Мастер Микс» в лунки планшета для проведения ПЦР

Добавить по 5 мкл экстрагированных РНК.

Поставить контрольные реакции амплификации:

1) Отрицательный контрольный образец (ОКО)– внести в пробирку (или лунку планшета) 5 мкл ОКО;

2) Положительный контрольный образец (ПКО) – внести в пробирку (или лунку планшета) 5 мкл ПКО,

где ПКО – это (ПКО-С).

Герметично закрыть планшеты пленкой. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках – удалить кратковременным центрифугированием.

2.2. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

2.2.1. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки (или планшеты) в амплификатор.

2.2.2. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор, как указано в табл. 2 .

Таблица 2. Параметры амплификации

Шаг	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	55	10 мин	1
2	95	2 мин	1
3	95	5 сек	5
4	60	15 сек	
5	67	15 сек	
6	95	5 сек	40
7 Детекция по каналам: FAM/Green, ROX/Orange	60	15 сек	
8	67	15 сек	

2.2.3. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок или исследуемых образцов, внесенных в лунки планшета для формы 2) в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончании, если это позволяет программное обеспечение прибора.

2.2.4. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента). Запустить амплификатор.

- Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для всех каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5F1 и «MaxReading/Максим. Сигнал» – 10F1.

- На амплификаторе «Quant Studio 5» во вкладке «Properties» выбрать в поле Rune mode «Fast» (Быстрый) во вкладке «Plate» - «Advanced Setup» в качестве канала детекции HCV необходимо выбрать ROX по длинам волн флуоресценции.

- Для прибора «ДТпрайм» войти во вкладку «Настройки» в ней найти «экспозиция измерений» и установить значение 3000 для всех каналов. Далее войти в «разное» и во вкладке «Коэффициент преобразования» установить 7,0. Во вкладке «Фильтр» поставить галочку и установить границы валидности равными 97.

- Для прибора «CFX96» В окне Run Setup во вкладке Protocol нажать кнопку Select Existing, в окне Select Protocol выбрать необходимый файл с программой амплификации, нажать кнопку Открыть. В окне Run Setup перейти во вкладку Plate, нажать кнопку Select Existing, в окне Select Plate выбрать необходимый файл со схемой планшета, нажать кнопку Открыть. Отредактировать схему, нажав на кнопку Edit selected. Во вкладке Select Fluorophores, выбрать в колонке Selected флуорофоры, указанные в инструкции по применению набора. В меню Sample type выбрать Unknown для всех образцов. Запустить выполнение программы, нажав на кнопку Start Run

3. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

I. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

а) для приборов типа «Rotor-Gene»*:

- установить значение параметра выбросов («NTC threshold/Порог Фона») – 5%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0–30 %**;

- установить значение параметра пороговой линии («Threshold/Порог») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02–0,2**;

- при необходимости допускается активация функций «Dynamic tube/Динамич.фон» и «Slope Correct/Коррек. Уклона».

б) для приборов «CFX96»*:

- установить значение параметра пороговой линии («Single Threshold») – 20. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25–500**;

- при необходимости допускается активация функций «Apply Fluorescence Drift Correction» и «Baseline Subtracted Curve fit».

в) для приборов «ДТпрайм»*:

- установить «Метод» – «Пороговый (Ct)»;

- установить значение параметра пороговой линии 5 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0–30%.**

г) для приборов «Quant Studio 5»*:

- установить значение параметра пороговой линии 5 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0–30%.**

д) для прочих амплификаторов – см. примечание².

* в зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.

** Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.

Набор реагентов «ГепАЭК С» валидирован со всеми указанными амплификаторами.

II. 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.

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).

III. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	Значение «Ct» по каналу FAM/Green	Значение «Ct» по каналу HEX/Yellow	Значение «Ct» по каналу ROX/Orange
ОКО	Не детектируется	Не детектируется	Не детектируется
ПКО-С	≤ 35	Не детектируется	≤ 35
ВКО	≤ 35	≤ 35	≤ 35

В случае несоответствия контрольных точек ОКО и ПКО необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии постановки ПЦР.

IV. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Таблица интерпретации результатов исследования образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу FAM/Green (ВКО)	Значение «Ct» по каналу ROX/Orange (HCV)
Положительный	+/-	≤ 38
Отрицательный	+	Не детектируется
Невалидный	—	—

Примечание:

«—» обозначает отсутствие значения «Ct», график амплификации не пересекает пороговую линию.

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

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

В случае невалидного результата требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа внесения клинического материала в ПЦР-смесь или со стадии забора материала у пациента.

Повторный невалидный результат свидетельствует о некачественном отборе клинического материала и требует перепостановки начиная с этапа отбора клинического материала.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора реагентов «ГепАЭК С» – 12 месяцев с даты приемки ОБТК предприятия-изготовителя. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение компонентов для амплификации: Смесь 1(С), Смесь 2, положительный контрольный образец (ПКО-С), отрицательный контрольный образец (ОКО) должно осуществляться в морозильных камерах или морозильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия изготовителя при температуре от -24 °С до -16 °С в течение всего срока годности.

После вскрытия неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в морозильных камерах или морозильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от -24 °С до -16 °С до истечения срока годности. Допускается заморозка/оттаивание компонентов набора реагентов до 10 раз.

Транспортирование

При температуре от 2 до 8°C транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида не более 30 суток.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «ГепатЭК С» для качественного выявления РНК вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени соответствует ТУ 21.20.23-363-70423725-2022, национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности.

По вопросам, касающимся качества и обращения набора реагентов «ГепатЭК С», следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, 1а, Закрытое Акционерное Общество «ЭКОлаб» (ЗАО «ЭКОлаб»); тел. 8 (49643) 3-23-11, 3-30-93, тел/факс 8(49643) 3-30-85, 8 (800) 333-33-47, ekolab-sekretar@mail.ru.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов, заявленным для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия потребитель должен предоставить:

1. набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
2. все спорные исследуемые образцы пациентов;
3. протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.
4. протоколы исследования с использованием других методов/наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЗУЕМЫЕ НА УПАКОВКЕ И ЭТИКЕТКАХ

	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Предел температуры
	Дата изготовления
	Код партии
	Номер по каталогу
	Содержимого достаточно для проведения 96- тестов

	Использовать до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Запрет на повторное применение
	Беречь от влаги
	Хрупкое, обращаться осторожно

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе



С.Г. Марданлы

«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

«25» 07 2023 г.



П.К. Варнавичус

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 13 ЛИСТОВ

«25» 07 2023 год

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



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

13 лист 06
Ген. директор ЗАО "ЭКОлаб"
Гашенко Т.Ю.
«25» 07 2023 г.

