



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А.Н. Тороповский
«26» января 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для генотипирования вируса
гепатита С методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ
«НЕРА-С-ГЕН-тест»**

ТУ 21.20.23-022-97638376-2020

Содержание

Список сокращений	3
Введение.....	4
1. Назначение.....	7
2. Принцип метода	8
3. Состав набора реагентов	10
4. Характеристики набора реагентов.....	13
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов	21
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	21
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов.....	24
8. Анализируемые образцы	25
9. Подготовка компонентов набора для исследования.....	30
10. Проведение анализа	31
11. Регистрация и интерпретация результатов.....	34
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов	38
13. Утилизация	40
14. Гарантийные обязательства, контакты	41
Приложение А.....	42

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ОТ	обратная транскрипция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	комплементарная ДНК
РНК	рибонуклеиновая кислота
НСV	вирус гепатита С
ВКО	внутренний контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
КОЧ	контрольный образец для определения чувствительности
КОС	контрольный образец специфичности

Введение

Инфекция вирусом гепатита С – основная причина острых и 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, криоглобулинемический нефрит и В-клеточная лимфома. Важной особенностью вируса гепатита С является то, что он имеет несколько генотипов (к настоящему времени известно 8 генотипов), определение которых необходимо для выбора соответствующей противовирусной терапии, прогностической оценки течения заболевания и возможных осложнений.

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

Научная обоснованность целевого анализа заключается в специфичности целевого анализа (уникальности последовательности РНК) в отношении геномов генотипов вируса С – 1a, 1b, 2, 3, 4, 5a и 6.

Вирус гепатита С – представитель семейства флавивирусов (Flaviviridae). Геном представлен одонитевой линейной молекулой РНК и состоит из следующих структурно-функциональных элементов: 5`UTR-*C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B*-3`UTR^{1,2}. Важной особенностью генома является высокая гетерогенность.

В тест-системе НЕРА-С-ГЕН-тест для дифференциации генотипов использованы фрагменты генов: для 1a – *NS5B*, 1b – *NS5B*, 2 – *NS5B*, 3 – *NS3*, 4 – *NS5B*, 5a – *NS5B*, 6 – ген структурного белка капсида С (core protein). Выбор обуславливается относительной консервативностью регионов у представителей одного генотипа. Следует отметить, что в разных тест-системах могут использоваться различные регионы для дифференциации генотипов (например,

¹ Chevaliez S., Pawlotsky J.-M. Chapter 1. HCV Genome and Life Cycle. In: Tan S.-L. (ed.), Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. Norfolk (UK): Horizon Bioscience, 2006. P. 5–47.

² González-Candelas F., López-Labrador F.X., Bracho M.A. Recombination in Hepatitis C Virus // Viruses. 2011. Vol. 3. P. 2006–2024.

5'UTR³), и в случае выявления рекомбинантных вирусов возможно расхождение между результатами генотипирования тест-систем разных производителей. Так, например, на территории Российской Федерации распространен рекомбинантный вариант 2k/1b с точкой рекомбинации, приходящейся на район гена NS2^{3,4,5}. Эта точка рекомбинации характерна также для большинства других известных рекомбинантных генотипов³. Вместе с тем, большинство препаратов антивирусной терапии, использующихся при лечении вирусного гепатита С, являются ингибиторами NS3/4A, NS5A, NS5B^{6,7,8,9}, что определяет терапевтическую целесообразность выявления участка генома, расположенную ниже наиболее часто встречающейся точки рекомбинации (район гена NS2).

Область применения набора реагентов: клиническая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: проведение генотипирования вируса гепатита С (генотипы 1a, 1b, 2a, 2, 3, 4, 5a и 6) у пациентов с выявленным вирусом гепатита С для выбора лекарственного препарата для проведения противовирусной терапии пациентам с подтвержденной вирусемией, в соответствии с Клиническими

³ Cai Q., Zhao Z., Liu Y., Shao X., Gao Z. Comparison of three different HCV genotyping methods: Core, NS5B sequence analysis and line probe assay // International Journal of Molecular Medicine. 2012. P. 347–352.

⁴ Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., Magnius L.O. A Natural Intergenotypic Recombinant of Hepatitis C Virus Identified in St. Petersburg // Journal of Virology. 2002. Vol. 76 (8). P. 4034–4043.

⁵ Demetriou V.L., Kyriakou E., Kostrikis L.G. Near-full genome characterisation of two natural intergenotypic 2k/1b recombinant hepatitis C virus isolates // Advances in Virology. 2011 (710438). P. 1–7.

⁶ Николаева Л.И., Сапронов. Вирус гепатита С: мишени для терапии и новые лекарственные препараты // Вопросы вирусологии. 2021. Т. 57. № 5. С. 10–15.

⁷ Keikha M., Eslami M., Yousefi B., Ali-Hassanzadeh M., Kamali A., Yousefi M., Karbalaei M. HCV genotypes and their determinative role in hepatitis C treatment // Virus Disease. 2020. Vol. 31. P. 235–240.

⁸ Kumar A., Rajput M.K., Paliwal D., Yadav A., Chhabra R., Singh S. Genotyping & diagnostic methods for hepatitis C virus: A need of low-resource countries // Indian Journal of Medical Research. 2018. Vol. 147 (5). P. 445–455.

⁹ Zopf S., Kremer A.E., Neurath M.F., Siebler J. Advances in hepatitis C therapy: What is the current state - what come's next? // World Journal of Hepatology. 2016. Vol. 8 (3). P. 139–147.

рекомендациями: «Острый гепатит С (ОГС) у взрослых», В17.1 (Разработчик: Некоммерческое партнерство «Национальное научное общество инфекционистов» (ННОИ)) и для определения необходимости проведения противовирусной терапии пациентам и схемы в соответствии с Клиническими рекомендациями: «Хронический вирусный гепатит С (ХВГС) у взрослых», В18.2 (Утверждены: Профильная комиссия Министерства Здравоохранения Российской Федерации по специальности «Инфекционные болезни», Согласованы: Научным советом Министерства Здравоохранения Российской Федерации).

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 «НЕРА-С-ГЕН-тест» не выявлено.

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: Набор реагентов «НЕРА-С-ГЕН-тест» предназначен для качественного выявления специфичных участков геномной РНК вируса гепатита С и его генотипов методом одностадийной мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией с обратной транскрипцией в пробах РНК, выделенных из плазмы крови К2-ЭДТА человека, у пациентов с выявленным вирусом гепатита С для проведения генотипирования вируса гепатита С для выбора лекарственного препарата для проведения противовирусной терапии пациентам с подтвержденной виремией, в соответствии с Клиническими рекомендациями: «Острый гепатит С (ОГС) у взрослых», В17.1 (Разработчик: Некоммерческое партнерство «Национальное научное общество инфекционистов» (ННОИ)) и для определения необходимости проведения противовирусной терапии пациентам и схемы в соответствии с Клиническими рекомендациями: «Хронический вирусный гепатит С (ХВГС) у взрослых», В18.2 (Утверждены: Профильная комиссия Министерства Здравоохранения Российской Федерации по специальности «Инфекционные болезни», Согласованы: Научным советом Министерства Здравоохранения Российской Федерации).

Функциональное назначение: полученные результаты могут использоваться для выбора лекарственного препарата для проведения противовирусной терапии пациентам с подтвержденной виремией, в соответствии с Клиническими рекомендациями: «Острый гепатит С (ОГС) у взрослых», В17.1 (Разработчик: Некоммерческое партнерство «Национальное научное общество инфекционистов» (ННОИ)) и для определения необходимости проведения противовирусной терапии пациентам и схемы в соответствии с Клиническими рекомендациями: «Хронический вирусный гепатит С (ХВГС) у взрослых», В18.2 (Утверждены: Профильная комиссия Министерства Здравоохранения Российской Федерации по специальности «Инфекционные болезни», Согласованы: Научным советом Министерства Здравоохранения Российской Федерации) у пациентов с выявленным вирусным гепатитом С.

Потенциальные потребители медицинского изделия

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

2. Принцип метода

Метод

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

Тип анализируемого образца

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

Принцип определения

Качественное выявление специфичных участков геномной РНК генотипов вируса гепатита С методом мультиплексной одностадийной реакции обратной транскрипции с последующим проведением аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробах РНК, выделенных из клинического материала, включает в себя три этапа:

1. Подготовка ОТ-ПЦР;
2. Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;
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 оптимизированный буфер.

В составе смесей олигонуклеотидов присутствуют праймеры и флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой

ДНК-мишени и гидролизуются (разрушаются) *Taq*-полимеразой, в результате чего разобщаются краситель и тушител, и происходит нарастание интенсивности флуоресценции по соответствующему диапазону оптического спектра. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путём измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

Форма комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-А», предназначенная для выявления генотипов 1a, 1b, 2 и 3, включает смесь олигонуклеотидов А.

Форма комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-АВ», предназначенная для выявления генотипов 1a, 1b, 2, 3, 4, 5a и 6, включает смеси олигонуклеотидов А и В.

Смесь олигонуклеотидов А содержит реагенты для выявления генотипов 1a, 1b, 2 и 3, а также ВКО (табл. 1).

Смесь олигонуклеотидов В содержит реагенты для выявления генотипов 4, 5a и 6, а также ВКО (табл. 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Смесь олигонуклеотидов	Канал, соответствующий флуорофору				
	FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red	Cy5.5 / Crimson
А	генотип 1a HCV	ВКО	генотип 1b (2k/1b) HCV	генотип 2 HCV	генотип 3 HCV
В	генотип 4 HCV	ВКО	—	генотип 5a HCV	генотип 6 HCV

ВКО позволяет оценить качество и эффективность выделения РНК и определить наличие возможных ингибиторов обратной транскрипции и амплификации в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

Ограничения метода

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

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

Использование набора с истёкшим сроком годности или нарушение условий хранения набора.

Нарушение условий хранения при транспортировании образцов.

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

3. Состав набора реагентов

Формы комплектации:

Набор представлен двумя формами комплектации:

– «НЕРА-С-ГЕН-тест-А», предназначенный для выявления генотипов 1a, 1b, 2 и 3;

– «НЕРА-С-ГЕН-тест-АВ», предназначенный для выявления генотипов 1a, 1b, 2, 3, 4, 5a и 6.

Выбор формы комплектации обуславливается популяционными особенностями распределения генотипов^{10,11}.

Количество анализируемых проб

1. Форма комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-А» рассчитана на проведение 96 реакций, что соответствует определению 94 (47 при постановках в дублях) исследуемых образцов, отрицательных и положительных образцов при единичном запуске амплификатора на 96 лунок или 32 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

2. Форма комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-АВ» рассчитана на проведение 192 реакций, что соответствует определению 92 (46

¹⁰ Клинические рекомендации «Хронический вирусный гепатит С (ХВГС) у взрослых» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2018. 90 с.

¹¹ Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. World Health Organization, 2018. 84 p.

при постановках в дублях) исследуемых образцов, отрицательных и положительных контрольных образцов при двух запусках амплификатора на 96 лунок или 32 единичные постановки исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Состав набора реагентов

Таблица 2 – Состав формы комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-А»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1.	ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2.	Смесь олигонуклеотидов А	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 1 440 мкл
3.	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 160 мкл
4.	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1600 мкл
5.	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 950 мкл

Примечание: Эксплуатационная документация (инструкция по применению и паспорт качества) не входит в состав изделия, но 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 холодоэлементами. Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

Таблица 3 – Состав формы комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-АВ»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1.	ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 960 мкл
2.	Смесь олигонуклеотидов А	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 1 440 мкл
3.	Смесь олигонуклеотидов В	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок синего цвета	1 пробирка, 1 440 мкл
4.	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 320 мкл
5.	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки, по 1 600 мкл
6.	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 930 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 холодоэлементами. 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 ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты и оптимизированный буфер.

Смеси олигонуклеотидов готовы к использованию и содержат праймеры и зонды, предназначенные для выявления специфических мишеней (табл. 1).

ПКО готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов геномной кДНК выявляемых генотипов вируса гепатита С 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 ДНКаз и РНКаз.

ВКО готов к использованию и представляет собой препарат армированной РНК.

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 4 – Набор реагентов «НЕРА-С-ГЕН-тест»

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
1. Технические характеристики		1
1. Внешний вид		
Форма комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-А»		
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов А	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
Форма комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-АВ»		
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов А	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов В	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок синего 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
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-022-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12

1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-022-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-022-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
2. Функциональные характеристики		
2.1 Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО для реакционной смеси А: по каналам FAM, ROX, Cy5 и Cy5.5 $Ct \leq 30$, HEX $Ct \leq 32$; для реакционной смеси В: FAM, Cy5 и Cy5.5 $Ct \leq 30$, HEX $Ct \leq 32$.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.2 Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО Ct по каналам FAM, ROX, Cy5 и Cy5.5 Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует) или $Ct > 35$, а по каналу HEX $Ct \leq 32$.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.3 Прохождение реакции в пробирках с КОС	В пробирках с КОС по каналу FAM, ROX, Cy5 и Cy5.5 Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), а по каналу HEX $Ct \leq 32$.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.4 Прохождение реакции в пробирках с КОЧ	В пробирках с КОЧ по каналам FAM, ROX (только для реакционной смеси А), Cy5 и Cy5.5 во всех повторях (не менее 3) каждой реакционной смеси $Ct \leq 35$, а по каналу HEX $Ct \leq 32$.	Раздел 7, пункт 7.8.2

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

В качестве стандартных контрольных образцов для определения чувствительности (КОЧ-1а, КОЧ-1б, КОЧ-2, КОЧ-3, КОЧ-4, КОЧ-5а, КОЧ-6) используют смеси плазмид с синтетическими вставками фрагмента кДНК выявляемых генотипов вируса гепатита С с концентрацией 4 000 копий/мл и фрагмента генома бактериофага с концентрацией 100 000 копий/мл в 10 % ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА):

В качестве контрольного образца специфичности (КОС) используют раствор геномной ДНК человека, выделенной из клеточной линии Jurkat с концентрацией 1 000 копий на 5 мкл (200 000 копий/мл).

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к РНК генотипов вируса гепатита С 1a, 1b, 2, 3, 4, 5a и 6.

4.2.1.1 Подтверждена возможность обнаружения РНК вируса гепатита С (от 1a до 6) **с использованием стандартного образца NIBSC:**

– 4th HCV RNA Genotype Panel for Nucleic Acid Amplification Techniques. NIBSC code: 14/290, состоящий из семи флаконов, представляющих шесть основных генотипов: флакон 14/276 – HCV генотип 1a, 14/278 – HCV генотип 1b, 14/280 – HCV генотип 2i, 14/282 – HCV генотип 3a, 14/284 – генотип HCV4r, 14/286 – HCV генотип 5a, 14/288 – генотип 6i.

При проведении тестирования с использованием панели 4th HCV RNA Genotype Panel for Nucleic Acid Amplification Techniques. NIBSC code: 14/290 получены достоверные результаты, что подтверждает возможность обнаружения испытуемым набором реагентов «НЕРА-С-ГЕН-тест» различных генотипов (от 1a до 6) гепатита С.

4.2.1.2 Аналитическая специфичность: проверка эффекта потенциально перекрестных реагентов.

Подтверждено отсутствие неспецифических реакций в присутствии НК штаммов:

- из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США): *Propionibacterium acnes* (ATCC® 29399™), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, Strain Seattle 1945 (ATCC® 25923™), *Staphylococcus epidermidis*, FDA Strain PCI 1200 (ATCC® 12228™), *Staphylococcus haemolyticus* ATCC™ 29970™.

- из коллекции «ГКПМ-ОБОЛЕНСК»: *Escherichia coli* M-17(номер штамма B-2929), *Candida albicans* NCTC 885-653 (номер штамма B-7940)

в максимальной концентрации от 10^6 до 10^7 клеток на мл.

4.2.1.3 Аналитическая специфичность: проверка эффекта потенциально интерферирующих веществ

Перечень проверенных потенциально интерферирующих веществ приведен в разделе 8.3 Инструкции.

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

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

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

Прочие интерферирующие вещества в валидированных концентрациях интерферентов не оказывают влияние на результаты качественного выявления специфичных участков геномной РНК вируса гепатита С и его генотипов с помощью исследуемого набора «HEPA-C-ГЕН-тест».

4.2.2 Аналитическая чувствительность (предел обнаружения, LOD)

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

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

в HCV-негативной плазме крови К2-ЭДТА человека в диапазоне предполагаемого предела обнаружения для образцов объемом 100 мкл и 1000 мкл.

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

Объем образца	Используемый амплификатор	Концентрация, МЕ/мл (LOD) с доверительной вероятностью 95%	Доверительный интервал 95%
100 мкл	ДТпрайм	1514,8	95%ДИ: 1513,37-1516,23
	CFX 96	1520,4	95%ДИ: 1518,97-1521,83
	Rotor-Gene Q	1510,9	95%ДИ: 1509,47-1512,33
	Quant Studio 5	1510,2	95%ДИ: 1508,77-1511,63
1000 мкл	ДТпрайм	77,3	95%ДИ: 75,87-78,73
	CFX 96	77,1	95%ДИ: 75,67-78,53
	Rotor-Gene Q	77,1	95%ДИ: 75,67-78,53
	Quant Studio 5	76,5	95%ДИ: 75,07-77,93

Для верификации **предела обнаружения при тестировании различных генотипов вируса гепатита С (от 1a до 6)** использовали образцы панели стандарта NIBSC:

– 4th HCV RNA Genotype Panel for Nucleic Acid Amplification Techniques. NIBSC code: 14/290, состоящий из семи флаконов, представляющих шесть основных генотипов: флакон 14/276 – HCV генотип 1a, 14/278 – HCV генотип 1b, 14/280 - HCV генотип 2i, 14/282 – HCV генотип 3a, 14/284 – генотип HCV4r, 14/286 – HCV генотип 5a, 14/288 – генотип 6l.

Полученные результаты подтвердили способность набора реагентов «НЕРА-С-ГЕН-тест» выявлять генотипы 1a, 1b, 2i, 3a, 4r, 5a, 6l в концентрации ~1500 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл, ~77 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 1000 мкл с верхним односторонним доверительным интервалом 95 %, превышающим ожидаемую частоту выявления 95 %.

4.2.3 Прецизионность в условиях повторяемости и воспроизводимости, можно заключить:

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

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

4.3. Характеристики клинической эффективности

Для проведения клинических испытаний было использован 41 образец плазмы крови К2-ЭДТА человека, от пациентов с выявленным вирусом гепатита С в возрасте от 12 лет до 65 лет (от 17 женщин и 24 мужчин) имеющие различные стадии соответствующего заболевания. Образцы получены из банка остаточных аликвот, сформированного в процессе рутинной лечебно-диагностической практики ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

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

Также для оценки работы набора в отношении различных генотипов (от 1b до 6) HCV в качестве клинических образцов (образцы под номерами 42-48) рассматривались образцы стандарта, приобретенного в 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 – генотип HCV4r, 14/286 – HCV генотип 5a, 14/288 – генотип 6l.

Каждый образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «НЕРА-С-ГЕН-тест», производства ООО «ТестГен», для оценки межсерийной сходимости.

Таким образом, проверка качества, безопасности и эффективности испытываемого медицинского изделия была проверена в 156 опытах.

Испытания проводились по средствам параллельного проспективного исследования диагностических характеристик набора реагентов «НЕРА-С-ГЕН-тест» каждой формы комплектации на основании сопоставления результатов тестирования одних и тех же проб клинического материала испытываемым набором реагентов «НЕРА-С-ГЕН-тест», производства ООО «ТестГен» и набором сравнения «АмплиСенс® HCV-генотип-FL», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия.

Свидетельством правильности работы исследуемого медицинского изделия будет совпадение результатов.

При испытании образцов плазмы крови К2-ЭДТА от пациентов, у которых показано отсутствие РНК вируса гепатита С

(отрицательные образцы), но подтверждено наличие 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 – 3 образца, перекрёстной реактивности не наблюдалось, неспецифических реакций выявлено не было.

Для проведения ПЦР-исследования были использованы следующие амплификаторы:

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

Так как форма комплекта «НЕРА-С-ГЕН-тест-А», предназначена для выявления генотипов 1a, 1b, 2 и 3, то расчет диагностических характеристик по отношению к генотипам 4, 5 и 6 не вели.

Доверительные интервалы (ДИ) диагностических характеристик были рассчитаны по методу Клоппера и Пирсона (Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper C., Pearson E. The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial // *Biometrika*. 1934. Vol. 26 (4). P. 404–413. doi:10.2307/2331986).

Диагностические характеристики испытуемого набора были рассчитаны с доверительной вероятностью 95%.

Воспроизводимость результатов 100%.

Таблица 5 – Характеристики клинической эффективности

Определяемый анализ	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95%	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95%
«НЕРА-С-ГЕН-тест-А»				
генотип HCV 1a	10	292	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)	100% (95% ДИ: 98,74%-100%)
генотип HCV 1b	30	252	100% (95% ДИ: 88,43%-100%)	100% (95% ДИ: 98,55%-100%)
генотип HCV 2	8	296	100% (95% ДИ: 63,06%-100%)	100% (95% ДИ: 98,76%-100%)
генотип HCV 3	6	300	100% (95% ДИ: 54,07%-100%)	100% (95% ДИ: 98,78%-100%)
«НЕРА-С-ГЕН-тест-АВ»				
генотип HCV 1a	14	10	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)	100% (95% ДИ: 98,74%-100%)
генотип HCV 1b	20	8	100% (95% ДИ: 88,43%-100%)	100% (95% ДИ: 98,55%-100%)
генотип HCV 2	8	14	100% (95% ДИ: 63,06%-100%)	100% (95% ДИ: 98,76%-100%)
генотип HCV 3	4	4	100% (95% ДИ: 54,07%-100%)	100% (95% ДИ: 98,78%-100%)
генотип HCV 4	2	2	100% (95% ДИ: 15,81%-100%)	100% (95% ДИ: 98,82%-100%)
генотип HCV 5a	2	2	100% (95% ДИ: 15,81%-100%)	100% (95% ДИ: 98,82%-100%)
генотип HCV 6	2	2	100% (95% ДИ: 15,81%-100%)	100% (95% ДИ: 98,82%-100%)

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 неквалифицированным персоналом;

6. Использование непригодного для применения набора (использование по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для генотипирования гепатита С методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-С-ГЕН-тест»» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

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

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

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

Реагенты, входящие в набор «НЕРА-С-ГЕН-тест», 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) (СП 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 соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- 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 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Вортекс;
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объёма;
4. Холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой не выше -16 °С;
5. Амплификатор¹² с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson например, CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher 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 «DNase-free» и «RNase-free».

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, Ахуген, США);
2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 или 2,0 мл;
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) или оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенку пробирки) для ПЦР: пробирки для ПЦР объёмом 0,1 или 0,2 мл¹³, 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;

¹² 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.

¹³ Убедитесь в совместимости пробирок для ПЦР 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 (например, ООО «ИнтерЛабСервис», Россия);
7. Набор для выделения РНК 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.

Принцип определения

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 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 объемом 1,5 или 2,0 мл, свободную от РНКаз.

Условия транспортирования и хранения плазмы крови К2-ЭДТА:

Допускается хранение плазмы К2-ЭДТА при температуре от +2 °С до +8 °С до 5 суток, при температуре от -18 °С до -22 °С – до 3 месяцев, при температуре -70 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов плазмы К2-ЭДТА.

Для выделения РНК использовать не менее 100 мкл плазмы. Повышение аналитической чувствительности набора возможно благодаря использованию большего объема 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, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13), действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности.

Утилизация клинического материала (класс В), как 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 К2-ЭДТА рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала «НК-Экстра» по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019 производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение: РЗН 2021/15428 от 24.09.2021).

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-ГЕН-тест».

Образец ОКО также проходит процедуру выделения РНК в объёме 100 мкл с добавлением 10 мкл ВКО. Если инструкцией производителя для выделения РНК предусмотрено использование большего объёма образца, следует довести объём ОКО 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-ГЕН-тест» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «НЕРА-С-ГЕН-тест», и, предположительно, влиять на способность набора реагентов выдавать достоверные результаты.

Интерферирующие вещества могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

- 1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);
- 2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение клинического образца гемоглобином крови может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения 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 «DNase-free» и «RNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

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

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

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

2. Отобрать необходимое количество пробирок (с оптически прозрачными крышками или стенками – в зависимости от используемого типа детектирующего амплификатора) объёмом 0,1 или 0,2 мл для ПЦР из следующего расчёта: для формы комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-АВ» – 2 х количество исследуемых образцов + 2 х ПКО + 2 х ОКО; для формы комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-А» – 1 х количество исследуемых образцов + 1 х ПКО + 1 х ОКО (табл. 7).

Таблица 7 – Принцип маркировки пробирок

	Исследуемые образцы			ПКО	ОКО
	1	2	n		
Реакционная смесь А (все формы комплектации)	+	+	+	+	+
Реакционная смесь В (форма комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-АВ»)	+	+	+	+	+

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

1. Подготовка ОТ-ПЦР;
2. Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;
3. Интерпретация результатов.

А) Подготовка ОТ-ПЦР

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

Для приготовления реакционной смеси А (для всех форм комплектации) необходимо:

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

Общий объём реакции – 25 мкл.

Для приготовления реакционной смеси В (только для формы комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-АВ») необходимо:

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

Общий объём реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакций.

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл для ПЦР (см. табл. 7).

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

3. Для формы комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-АВ»: в отдельной одноразовой стерильной пробирке типа

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

4. В соответствующие пробирки для ПЦР внести по 20 мкл реакционных смесей А или В (если смеси предусмотрены формой комплектации) (см. табл. 7).

5. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 5 мкл выделенной РНК. В пробирки для ПКОи ОКО препарат РНК не вносится.

6. Внести в соответствующие пробирки по 5 мкл ПКО.

7. Внести в соответствующие пробирки по 5 мкл ОКО, прошедший этап выделения НК.

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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;

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

6. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

7. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ОТ-ПЦР, адаптированный под большинство моделей амплификаторов («ДТпрайм», Rotor-Gene Q, QuantStudio 5), указан в таблице 8; протокол, адаптированный под амплификатор CFX96 (BioRad, США) указан в таблице 9.

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

9. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson.

10. Запустить ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

11. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

Таблица 8 – Протокол ОТ-ПЦР (для «ДТпрайм», Rotor-Gene Q, QuantStudio 5)

Стадия	Температура, °С	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	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson	45
	60	00:15		
	67	00:30		

Таблица 9 – Протокол ОТ-ПЦР (для CFX96)

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

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

11. Регистрация и интерпретация результатов

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

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне, соответствующем 5–20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t каналов FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red и Cy5.5/Crimson (табл. 1).

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

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификаторов Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene Q и аналогичных, активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal) для всех каналов детекции, кроме Cy5.5 / Crimson, для которого необходимо установить значение 20% в разделе «Устранение выбросов».

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для ОКО и ПКО для каждой реакционной смеси должны быть получены следующие результаты (табл. 10).

Таблица 10 – Результаты исследования для ОКО и ПКО

Контрольный образец	Значения Ct по каналам детекции, соответствующим флуорофорам				
	FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red	Cy5.5 / Crimson
Реакционная смесь А					
ОКО	> 35 или отсутствует	≤ 32	> 35 или отсутствует	> 35 или отсутствует	> 35 или отсутствует
ПКО	≤ 30	≤ 32	≤ 30	≤ 30	≤ 30
Реакционная смесь В					
ОКО	> 35 или отсутствует	≤ 32	не учитывается	> 35 или отсутствует	> 35 или отсутствует
ПКО	≤ 30	≤ 32	не учитывается	≤ 30	≤ 30

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 10, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации. При этом отсутствие сигналов по каналам детекции для образцов (таблица 11) следует считать достоверными; повторная постановка таких образцов не требуется.

При получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 10, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 10, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

Принципы интерпретации результатов отражены в таблице 11.

Генотип устанавливается путём сопоставления результатов ОТ-ПЦР в соответствующих реакционных смесях (табл. 11) при соблюдении условий:

для всех форм комплектаций:

- если результат соответствует одному генотипу, то выдаётся результат с указанием этого генотипа;

- если для одного исследуемого образца получено несколько генотипов, при этом значения C_t по соответствующим им каналам отличаются не более, чем на 8 циклов, то в результате указывается несколько генотипов; исключение составляют генотипы 1a и 1b, где при выявлении генотипа 1b возможен слабый подъём графика по 1a (1a в этом случае не учитывается);

- в случае выявления генотипа 1b, указывать «1b (возможный рекомбинант 2k/1b)» – в связи с тем, что на территории Российской Федерации распространен рекомбинантный вариант 2k/1b^{3,4,5}, и возможно получение различных результатов при использовании тест-систем разных производителей, использующих разные регионы генома вируса гепатита С для генотипирования;

- если для одного исследуемого образца получено несколько генотипов, при этом значения C_t по соответствующим им каналам отличаются на более, чем 8 циклов, то в результате не учитываются генотипы с более высокими значениями C_t ;

- если для одного исследуемого образца не получены значения C_t по генотипам, при этом у ВКО $C_t \leq 32$, указывается, что генотип не определён;

- в случае получения невалидного или сомнительного результата заключение не выдаётся, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ; при повторении сомнительного результата повторить исследование набором реагентов другого производителя или другим методом. Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация РНК, присутствие ингибиторов в препарате РНК, полученном из клинического материала, неверное выполнение протокола анализа, несоблюдение температурного режима ОТ-ПЦР и др.

Таблица 11 – Принцип интерпретации результатов

Значения Ct по каналам детекции					Результат
FAM / Green	ROX / Orange	Cy5 / Red	Cy5.5 / Crimson	HEX / Yellow	
Реакционная смесь А					
Генотип 1a	Генотип 1b (2k/1b)	Генотип 2	Генотип 3	ВКО	
–				≤ 32	генотип, соответствующий каналу, не выявлен, или концентрация ниже предела обнаружения
–	–	–	–	> 32	результат невалидный
≤ 35				не уч.	обнаружена РНК вируса, соответствующая каналу
> 35				не уч.	результат теста сомнительный для мишени, соответствующей каналу
Реакционная смесь В					
Генотип 4	–	Генотип 5	Генотип 6	ВКО	
–	не уч.	–	–	≤ 32	генотип, соответствующий каналу, не выявлен, или концентрация ниже предела обнаружения
–	не уч.	–	–	> 32	результат невалидный
≤ 35				не уч.	обнаружена РНК вируса, соответствующая каналу
> 35				не уч.	результат теста сомнительный для мишени, соответствующей каналу

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

для формы комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-А»:

– если генотип не определён, требуется проверить концентрацию РНК вируса HCV в исследуемом образце с помощью набора реагентов для определения вирусной нагрузки, так как при концентрации ниже 4 000 копий/мл возможность генотипирования отсутствует, или использовать набор реагентов для выявления других генотипов гепатита С (форма комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-АВ»).

для формы комплектации «НЕРА-С-ГЕН-тест-АВ»:

– если генотип не определён, требуется проверить концентрацию РНК вируса HCV в исследуемом образце с помощью набора реагентов для определения вирусной нагрузки, так как при концентрации ниже 4 000 копий/мл возможность генотипирования отсутствует. Генотип также может быть не определён в связи с нахождением других генотипов вируса гепатита С, не выявляемых настоящим набором реагентов (например, 1с, 7, 8), а также из-за наличия молекулярно-генетических полиморфизмов, приходящихся на область гибридизации праймеров и зондов в ОТ-ПЦР.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

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

Допускается заморозка/оттаивание набора «НЕРА-С-ГЕН-тест» 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-ГЕН-тест» 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 на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с 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-ГЕН-тест» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истёкшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

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

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

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

13. Утилизация

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

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

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

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

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

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

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует качество и безопасность набора реагентов «НЕРА-С-ГЕН-тест» 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

Е-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 генотипирования вируса гепатита С методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ «НЕРА-С-ГЕН-тест» соответствует следующим межгосударственным стандартам на продукцию:

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2011	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р 15.309-98	Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.
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 ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ГОСТ Р 56894-2016	Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1.

	Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем(маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования
ГОСТ 2.114-2016	Единая система конструкторской документации. Технические условия
ГОСТ 2.104-2006	Единая система конструкторской документации (ЕСКД). Основные надписи
ГОСТ Р 1.3-2018	Стандартизация в Российской Федерации. Технические условия на продукцию. Общие требования к содержанию, оформлению, обозначению и обновлению

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