«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«26» 05 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и количественного определения
РНК вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР
в реальном времени
«РеалБест ВГС ПЦР»
(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ВГС ПЦР» комплект 1 предназначен для выявления и количественного определения РНК вируса гепатита С (ВГС) в сыворотке (плазме) крови методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией фрагмента кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ – ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в реальном времени.

Набор может быть применён как для высокочувствительного скринирования донорской крови, так и в клинической практике для диагностики гепатита С, определения вирусной нагрузки и оценки эффективности противовирусной терапии.

Набор предназначен для применения с приборами «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Выделение РНК вируса гепатита С (ВГС) из сыворотки (плазмы) крови проводится с помощью набора «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ».

Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного специфического фрагмента кДНК (полученной методом обратной транскрипции из РНК ВГС), заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров на комплементарные последовательности, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В основе используемого метода регистрации лежит измерение уровня флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение уровня флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данной кДНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5’-конце флуоресцентный краситель, а на 3’-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи зонд расщепляется с 5’-конца, благодаря 5’-3’-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию уровня флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания уровня флуоресценции определяется исходным количеством кДНК в образце.

Достоверность анализа контролируется по наличию положительного результата в образцах ПКО и СПКО, которые подвергаются процедуре выделения РНК вместе с анализируемыми биопробами.

Учет эффективности выделения РНК из образцов обеспечивается выделением РНК ВГС из клинических проб совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок;
- слабый положительный контрольный образец (СПКО ВГВ/ВГС/ВИЧ), лиофилизированный – 1 фл.;
- положительный контрольный образец (ПКО ВГС), лиофилизированный – 2 фл.;
- калибровочный образец 1 (КО1 ВГС), лиофилизированный – 1 фл.;
- калибровочный образец 2 (КО2 ВГС), лиофилизированный – 1 фл.;
- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 2 флакона по 4 мл.

Набор дополнительно комплектуется: крышками для пробирок – 12 стрипов по 8 штук или плёнкой оптической – 3 листа.

Внимание! ПКО, СПКО, КО1, КО2 должны пройти процедуру выделения РНК с помощью набора «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» согласно инструкции к набору.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность анализа

Набор выявляет вирус гепатита С генотипов 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 2i, 3, 4, 5a, 6 независимо от субтипа. Образцы, содержащие РНК ВГС (выше предела обнаружения), определяются как

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

положительные. В образцах, не содержащих РНК ВГС, результат анализа гарантированно (в 100% образцах) должен быть отрицательным.

Чувствительность (предел обнаружения)

Набор гарантированно (в 100% образцов) выявляет РНК ВГС в концентрации не менее 15 МЕ/мл при выделении РНК из 1 мл образца (или не менее 15 МЕ в пробе).

Диапазон определяемых концентраций – от 100 до 10^8 МЕ РНК ВГС в 1 мл исследуемого образца.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в реальном времени: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой («Циклотемп», фирма СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным или фиксированным объёмом, со сменными наконечниками (фирма Biohit, Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);

– одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма Biohit, Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл и 0,25 мл (фирма Хеликон, Россия);

– емкость для сброса наконечников.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной РНК, полученные из образцов сыворотки (плазмы) крови с помощью набора для выделения нуклеиновых кислот (НК): «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» согласно инструкции по применению набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать положительный контрольный образец (ПКО) в трех повторах, слабый положительный контрольный образец (СПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения НК.

Внимание: в случае необходимости валидации аналитической системы в исследование должны быть также включены калибровочные образцы 1 и 2, в трех повторах каждый (см. Приложение 2).

Подготовка контрольных образцов к выделению НК: во флаконы с ПКО и СПКО внести по 1000 мкл РВК, перемешать на вортексе и выдержать при температуре от 18 до 25 °С в течение 15 мин; затем снова аккуратно перемешать.

Контрольные образцы после восстановления хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно, с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО, 1 СПКО и 3 ПКО; при постановке с калибраторами – ещё дополнительно – 3 КО1 и 3 КО2) пробирок с готовой реакционной смесью. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой. Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с готовой реакционной смесью для ОТ-ПЦР (ГРС) пронумеровать и расположить в штативе.

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной РНК (из пробирок, установленных в магнитный штатив). **Не захватывать частицы сорбента!**

7.4. Закрыть пробирки крышками или оптической пленкой.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента РНК ВГС и ВКО и детекции флуоресцентных сигналов. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Запрограммировать протокол проведения реакции ОТ-ПЦР:

1 стадия: 45°С – 30 мин;

2 стадия: 94°С – 1 мин;

3 стадия: 50 циклов (94°С – 10 сек, 60°С – 20 сек);

Измерение флуоресценции проводить при 60°С.

7.8. Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента кДНК ВКО в системе применён гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором FAM. Для детекции следует выбирать канал детекции «FAM».

Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента кДНК ВГС в системе применен гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором ROX. Для детекции следует выбирать канал детекции «ROX».

7.9. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.10. Запустить программу и провести ОТ-ПЦР с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При применении набора **«РеалБест ВГС ПЦР» (комплект 1)** *с прибором-амплификатором «iQ5 iCycler»и «CFX96» (фирмы «Bio-Rad», США) и программой «РеалБест диагностика» программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислению результатов. Программа выдает результат анализа в виде таблицы концентрации РНК ВГС в анализируемых образцах. Также программа отмечает образцы, анализ которых признан недействительным.*

При использовании других приборов-амплификаторов анализ и отбраковку результатов проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией и Приложением 1.

8.1. В ПКО и СПКО (а также КО1 и КО2) программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала специфического продукта амплификации фрагмента кДНК ВГС (по каналу «ROX») и определять значение порогового цикла Ct ВГС;

– нарастание сигнала амплификации фрагмента кДНК ВКО (канал ВКО) и определять значение порогового цикла Ct ВКО.

8.2. Результаты индивидуальной постановки ПЦР подлежат анализу и учету, если для ПКО значение Ct ВГС находится в диапазоне, указанном во вкладыше в наборы данной серии.

8.3. В отрицательном контрольном образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации фрагмента кДНК ВКО и определять C_t ВКО, при этом не должно быть достоверного нарастания сигнала специфического продукта амплификации кДНК ВГС. Если для ОКО значение Ct ВГС меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. Порядок действий в таком случае см. в п. 9.1.3.

8.4. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации фрагмента кДНК ВКО (канал «FAM») и определять Ct ВКО. Анализ пробы считается действительным, если для этого образца значение Ct ВКО по каналу «FAM» меньше или равно 40.

8.5. Вычислить $(Ct\ ВКО)_{ср}$ как среднее значение Ct ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО, СПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения Ct ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(Ct\ ВКО)_{ср}$. После отбраковки пересчитать $(Ct\ ВКО)_{ср}$ для оставшихся значений.

8.6. Для проведения корректного количественного вычисления концентрации РНК ВГС в анализируемых образцах необходимо, чтобы для ВКО образца значение Ct ВКО не

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

отличалось более чем на 2 от значения $(Ct\ ВКО)_{ср}$.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Качественный учёт результатов

9.1.1. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий РНК ВГС), если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 40 или не определяется. Если для такого образца значение Ct ВКО отличается от значения $(Ct\ ВКО)_{ср}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения. В случае повторения результата следует провести повторный забор образца крови и снова повторить анализ.

9.1.2. Анализируемый образец считается положительным, т.е. содержащим РНК ВГС, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40.

Если для такого анализируемого образца значение **Ct** ВКО отличается от значения $(\mathbf{Ct}\ ВКО)_{ср}$ более чем на 2, то такой образец учитывается **как положительный** без указания концентрации РНК. Для количественного анализа необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

9.1.3. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

9.1.4. Если для СПКО значение Ct ВГС больше 40 или не определяется, то все отрицательные результаты считаются недостоверными и требуют перестановки.

9.2. Количественный учёт результатов

Для количественного анализа рассчитать концентрацию РНК ВГС в исследуемых образцах в соответствии с Приложением 1 или с применением сервисной компьютерной программы «РеалБест диагностика» (которая проводит все операции по отбраковке и анализу образцов и приводит результаты в виде таблицы с концентрациями РНК ВГС в анализируемых пробах).

Внимание: При условии выделения РНК из образца объемом 1000 мкл, полученное значение соответствует концентрации РНК ВГС в МЕ/мл. Если выделение РНК образца производилось из меньшего объема, полученное значение следует умножить на ρ, где ρ=1000/объем образца в мкл. Таким образом будет получена концентрация РНК ВГС, выраженная в МЕ/мл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.2.1. Если вычисленное значение концентрации РНК ВГС в образце находится в диапазоне от 100 МЕ/мл до 10^8 МЕ/мл, результат определяется как положительный с указанием полученной концентрации РНК ВГС в образце (в МЕ/мл).

9.2.2. Если вычисленное значение концентрации РНК ВГС больше 10^8 МЕ/мл, то результат рекомендуется интерпретировать как положительный с концентрацией РНК ВГС «больше 10^8 МЕ/мл».

9.2.3. Если вычисленное значение концентрации РНК ВГС меньше 100 МЕ/мл, то результат рекомендуется интерпретировать как положительный с концентрацией РНК ВГС «меньше 100 МЕ/мл».

9.2.4. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий РНК ВГС), если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание наборов не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание наборов не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Расчёт концентрации РНК ВГС

При постановке реакции на приборе **«iQ5 iCycler»** или **«CFX96»** (фирма Bio-Rad, США) все операции по количественному анализу образцов можно провести с применением сервисной компьютерной программы **«РеалБест диагностика»**, поставляемой в качестве приложения к наборам.

В случае отсутствия указанного программного обеспечения или при постановке реакции на приборе «ДТ-96» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия) количественный анализ РНК ВГС следует производить по приведенным ниже формулам.

1. Для образцов ПКО, значение **C_t** которых находится в диапазоне значений, указанном во вкладыше в наборы данной серии, вычислить корректированные значения **C_t** ВГС с введением поправки на эффективность выделения, контролируемую по **C_t** ВКО, по формуле:

$Z_{пко} = C_t$ ПКО + (C_t ВКОср – C_t ВКО),

где:

$Z_{пко}$ - корректированное значение **C_t** ВГС для образца ПКО;

C_t ВКОср – среднее значение **C_t** ВКО, вычисленное по всем образцам (см. инструкцию);

C_t ПКО и **C_t ВКО** – значения **C_t** данного образца ПКО по каналам ROX и FAM, соответственно.

2. Вычислить среднее значение корректированного порогового цикла для ПКО **($Z_{пко_{ср}}$)**.

Отбраковке подлежат результаты анализа образцов ПКО, для которых **$Z_{пко}$** отличается более чем на 2 от значения **$Z_{пко_{ср}}$**. После отбраковки вычислить **$Z_{пко_{ср}}$** для оставшихся образцов.

3. Вычислить количество РНК ВГС в каждом исследуемом образце (**Q_k**) по формуле:

$$Q_k = 10^{X_k}\ [МЕ],$$

где:

$X_k = A + B \times (Z_{пко_{ср}} - Z_k)$;

A – коэффициент, определяемый как логарифм количества РНК ВГС в ПКО, приведенного в паспорте серии: **$A = \lg (Q_{пко})$;**

k – номер образца;

$Z_{пко_{ср}}$ - среднее значение **$Z_{пко}$** для образцов ПКО;

Z_k – корректированное значение **C_t** данного образца, вычисляемое по формуле:

$Z_k = C_t$ ВГС$_k$ + (C_t ВКО$_{ср}$ – C_t ВКО$_k$);

B – коэффициент, зависящий от эффективности амплификации и вычисляемый по формуле: **$B = \lg (2 \times Ea/100)$,** где **Ea –** эффективность амплификации в %. Для количественной оценки использовать значение **B = 0,3**.

4. Вычислить концентрацию РНК ВГС (в МЕ/мл) в каждом исследуемом образце по формуле:

$$C_k = {}^{Q_k}/_{V_k},$$

где **V_k** – объем образца в мл.

Таким образом, будет получена концентрация РНК ВГС в данном образце, выраженная в МЕ/мл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Валидация аналитической системы. Определение концентрации РНК ВГС в ПКО по калибровочному графику.

Для более точного определения концентрации РНК ВГС в исследуемых образцах необходимо провести валидацию аналитической системы путем сравнения паспортного значения концентрации РНК ВГС в ПКО со значением, полученным по калибровочному графику.

При работе на приборе **«iQ5 iCycler»** или **«CFX96»** (фирма Bio-Rad, США) *данную процедуру можно провести с применением сервисной компьютерной программы* **«РеалБест диагностика»**, *поставляемой в качестве приложения к наборам.*

В случае отсутствия указанного программного обеспечения или при постановке реакции на приборе «ДТ-96» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия) процедуру следует проводить в соответствии с приведенным ниже описанием:

1. Перед началом работы извлечь набор реагентов для выделения («РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ», любой из комплектов) и набор реагентов для выявления и количественного определения РНК ВГС из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать компоненты набора при температуре от 18 до 25°С не менее 30 мин.

2. Приготовить компоненты наборов и образцы ОКО, ПКО и СПКО в соответствии с инструкцией к используемым наборам для выделения НК и выявления РНК ВГС.

3. Во флаконы КО1 и КО2 добавить по **1 мл раствора для восстановления контрольных образцов (РВК)**, аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при комнатной температуре, после чего вновь тщательно перемешать, после восстановления хранить при температуре от 2 до 8 ° С не более 1 месяца.

4. Подготовить 11 пробирок для выделения в соответствии с инструкцией к используемому набору и промаркировать их: 1 пробирка ОКО, 1 пробирка СПКО, по 3 пробирки ПКО, КО1 и КО2.

5. Внести контрольные образцы в промаркированные соответствующим образом пробирки согласно инструкции к используемому набору для выделения НК.

6. Провести выделение РНК согласно инструкции.

7. Выделенную нуклеиновую кислоту перенести в промаркированные пробирки для ПЦР в соответствии с инструкцией к набору «РеалБест ВГС ПЦР», запрограммировать прибор, в соответствии с инструкцией к прибору задать значения концентраций КО1 и КО2, указанные в паспорте набора, и провести ПЦР.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Для каждого образца вычислить корректированное значение $\mathbf{C_t}$ по формуле:

$\mathbf{Z = C_t\ ВГС – (C_t\ ВКО_{ср} – C_t\ ВКО).}$

9. Вычислить среднее значение Z для ПКО, КО1, КО2 ($Zпко_{ср}$, $Z_{КО1ср}$, $Z_{КО2ср}$).

Отбраковке подлежат результаты анализа образцов, для которых **Z** отличается более чем на 2 от $\mathbf{Z_{ср}}$. После отбраковки вычислить $\mathbf{Z_{ср}}$ для оставшихся образцов.

10. Вычислить **B** – коэффициент для вычисления количества РНК ВГС по формуле:

$$\mathbf{B = (lg(Q_{КО1}) – lg(Q_{КО2})) / (Z_{КО2ср} – Z_{КО1ср});}$$

где: $\mathbf{Q_{КО1}}$ и $\mathbf{Q_{КО2}}$ – количество РНК ВГС в калибровочном образце 1 и 2, соответственно (указаны в паспорте набора);

При эффективности амплификации 100% $\mathbf{B = lg2 = 0,3.}$

11. По результатам анализа калибровочных образцов вычислить количество РНК ВГС в ПКО по аналитической формуле:

$$\mathbf{Q_{пко} = 10^{X_{пко}}\ [МЕ]},$$

где:

$$\mathbf{X_{пко} = lg\ (Q_{КО1}) + B \times (Z_{КО1ср} – Zпко_{ср});}$$

$\mathbf{Z_{КО1ср}}$ – среднее значение Z для образцов КО1;

$\mathbf{Zпко_{ср}}$ – среднее значение Z для образцов ПКО;

При эффективности амплификации 100% $\mathbf{B = Lg2 = 0,3.}$

12. Использование ПКО в качестве образца сравнения при дальнейших вычислениях концентрации РНК ВГС в исследуемых образцах допускается, если вычисленное значение количества РНК ВГС в ПКО отличается не более чем в 2 раза от значения, указанного в паспорте набора.

13. При выполнении всех указанных условий можно проводить вычисление количества РНК ВГС (в МЕ) в исследуемых образцах по следующей формуле с использованием значения коэффициента **B**, вычисленного по калибровочному графику:

$$\mathbf{Q_k = 10^{X_k}\ [МЕ]},$$

где:

$$\mathbf{X_k = lg\ (Q_{пко}) + B \times (Zпко_{ср} – Zk)}$$

Концентрация РНК ВГС в образце в таком случае вычисляется по следующей формуле:

$$\mathbf{C_k = {Q_k}/{V_k}},$$

где $\mathbf{V_k}$ – объем образца в мл.

Таким образом, будет получена концентрация РНК ВГС в данном образце, выраженная в МЕ/мл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«26» 05 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и количественного определения
РНК вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР
в реальном времени
«РеалБест ВГС ПЦР»
(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ВГС ПЦР» комплект 2 предназначен для выявления РНК вируса гепатита С (ВГС) в сыворотке (плазме) крови методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией фрагмента кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ – ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в реальном времени.

Набор может быть применён как для высокочувствительного скринирования донорской крови, так и в клинической практике для диагностики гепатита С, определения вирусной нагрузки и оценки эффективности противовирусной терапии.

Набор предназначен для применения с приборами «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Выделение РНК вируса гепатита С (ВГС) из сыворотки (плазмы) крови проводится с помощью набора «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ».

Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного специфического фрагмента кДНК (полученной методом обратной транскрипции из РНК ВГС), заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров на комплементарные последовательности, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение уровня флуоресценции в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

каждом цикле ПЦР. Увеличение уровня флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данной кДНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи зонд расщепляется с 5'-конца, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию уровня флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания уровня флуоресценции определяется исходным количеством кДНК в образце.

Достоверность анализа контролируется по наличию положительного результата в образце СПКО, который подвергается процедуре выделения РНК вместе с анализируемыми биопробами.

Учет эффективности выделения РНК из образцов обеспечивается выделением РНК ВГС из клинических проб совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок;
- слабый положительный контрольный образец (СПКО ВГВ/ВГС/ВИЧ), лиофилизированный – 1 фл.;
- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 фл., 4,0 мл.

Набор дополнительно комплектуется: крышками для пробирок – 12 стрипов по 8 штук или плёнкой оптической – 3 листа.

Внимание! СПКО должен пройти процедуру выделения РНК с помощью набора «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» согласно инструкции к набору.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность анализа

Набор выявляет вирус гепатита С генотипов 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 2i, 3, 4, 5a, 6 независимо от субтипа. Образцы, содержащие РНК ВГС (выше предела обнаружения), определяются как положительные. В образцах, не содержащих РНК ВГС, результат анализа гарантированно (в 100% образцах) должен быть отрицательным.

Чувствительность (предел обнаружения)

Набор гарантированно (в 100% образцов) выявляет РНК ВГС в концентрации не менее 15 МЕ/мл при выделении РНК из 1 мл образца (или не менее 15 МЕ/мл в пробе).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в реальном времени: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой («Циклотемп», фирма СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным или фиксированным объёмом, со сменными наконечниками (фирма Biohit, Финляндия);

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);

– одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма Biohit, Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл и 0,25 мл (фирма Хеликон, Россия);

– емкость для сброса наконечников.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной РНК, полученные из образцов сыворотки (плазмы) крови с помощью набора для выделения нуклеиновых кислот (НК): «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» согласно инструкции по применению набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать слабый положительный контрольный образец (СПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения НК.

Подготовка СПКО к выделению НК: во флакон с СПКО внести 1000 мкл РВК, перемешать на вортексе и выдержать при температуре от 18 до 25 °С в течение 15 мин; затем снова аккуратно перемешать.

СПКО после восстановления хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно, с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли 1 ОКО и 1 СПКО) пробирок с готовой реакционной смесью. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой. Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с готовой реакционной смесью для ОТ-ПЦР (ГРС) пронумеровать и расположить в штативе.

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной РНК (из пробирок, установленных в магнитный штатив). **Не захватывать частицы сорбента!**

7.4. Закрыть пробирки крышками или оптической пленкой.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента РНК ВГС и ВКО и детекции флуоресцентных сигналов. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Запрограммировать протокол проведения реакции ОТ-ПЦР:

1 стадия: 45°С – 30 мин;

2 стадия: 94°С – 1 мин;

3 стадия: 50 циклов (94°С – 10 сек, 60°С – 20 сек);

Измерение флуоресценции проводить при 60°С.

7.8. Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента кДНК ВКО в системе применён гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором FAM. Для детекции следует выбирать канал детекции «FAM».

Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента кДНК ВГС в системе применен гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором ROX. Для детекции следует выбирать канал детекции «ROX».

7.9. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

7.10. Запустить программу и провести ОТ-ПЦР с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При применении набора «**РеалБест ВГС ПЦР» (комплект 2)** *с прибором-амплификатором «iQ5 iCycler»и «CFX96» (фирмы «Bio-Rad», США) с программой «РеалБест диагностика» программа проводит все операции по анализу результатов. Также программа отмечает образцы, анализ которых признан недействительным.*

При использовании других приборов-амплификаторов анализ и отбраковку результатов проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

8.1. В слабом положительном контрольном образце программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала специфического продукта амплификации кДНК ВГС (канал «ROX») и определять значение порогового цикла Ct ВГС;

– нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла Ct ВКО.

8.2. В отрицательном контрольном образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации фрагмента кДНК ВКО и определять C_t ВКО, при этом не должно быть нарастания сигнала специфического продукта амплификации кДНК ВГС. Если для ОКО значение Ct ВГС меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. Порядок действий в таком случае см. в п. 9.3.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации фрагмента кДНК ВКО (канал «FAM») и определять Ct ВКО. Анализ пробы считается действительным, если для этого образца значение Ct ВКО по каналу «FAM» меньше или равно 40.

8.4. Вычислить $(Ct\ ВКО)_{ср}$ как среднее значение Ct ВКО всех анализируемых образцов (включая СПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения Ct ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(Ct\ ВКО)_{ср}$. После отбраковки пересчитать $(Ct\ ВКО)_{ср}$ для оставшихся значений.

8.5. Для проведения корректного анализа образца необходимо, чтобы для ВКО образца значение Ct ВКО не отличалось более чем на 2 от значения $(Ct\ ВКО)_{ср}$.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий РНК ВГС), если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 40 или не определяется. Если для такого образца значение Ct ВКО отличается от значения $(Ct\ ВКО)_{ср}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения. В случае повторения результата следует провести повторный забор образца крови и снова повторить анализ.

9.2. Анализируемый образец считается положительным, т.е. содержащим РНК ВГС, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40.

9.3. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

9.4. Если для СПКО значение Ct ВГС больше 40 или не определяется, то все отрицательные результаты считаются недостоверными и требуют перестановки.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание наборов не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание наборов не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru