

Amplitech HBV

Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК HBV методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech HBV)
по ТУ 21.20.23-023-19926214-2023

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

IVD

REF P016-0

 96

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	4
3 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ.....	4
4 РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ, ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ	4
5 СОСТАВ	4
6 ПРИНЦИП МЕТОДА.....	5
6.1 Прослеживаемость значения положительного контроля ПК1 HBV	5
6.2 Характеристика положительного контроля ПК2 HBV.....	6
7 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	6
8 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	6
9 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	8
10 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	8
10.1 Экстракция ДНК.....	8
10.2 Подготовка к проведению ПЦР	9
10.3 Проведение ПЦР и детекции.....	9
11 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	10
12 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ	11
13 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	12
13.1 Контроли, используемые в процессе исследования	12
13.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации	13
13.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований	13
14 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	13
14.1 Предел обнаружения	13
14.2 Диапазон измерения и предел измерения	13
14.3 Аналитическая специфичность	14
14.4 Прецизионность измерения.....	15
14.5 Правильность измерения	15
14.6 Диагностические характеристики.....	15
14.7 Корреляция	15
15 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.....	16
15.1 Срок годности	16
15.2 Хранение.....	16
15.3 Транспортирование.....	16
15.4 Эксплуатация.....	16
16 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ.....	16
17 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	16
18 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	17
19 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА	17
20 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	17

ВВЕДЕНИЕ

1. Настоящая инструкция по применению версии 14.03.23 распространяется на медицинское изделие «Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК HBV методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech HBV) по ТУ 21.20.23-023-19926214-2023» (далее – набор).

Краткое наименование набора: Amplitech HBV.

Набор следует применять в соответствии с действующей версией инструкции по применению. Для удобства работы в лаборатории допускается использовать действующую версию краткого руководства по применению набора.

2. Вирус гепатита В (HBV) – ДНК-содержащий вирус из семейства *Hepadnaviridae*, который поражает печень. Метод ПЦР позволяет выявлять ДНК HBV в плазме крови в среднем через 30 дней после инфицирования, когда специфические антитела отсутствуют, что позволяет диагностировать заболевание на максимально ранних сроках. В некоторых случаях ДНК HBV является единственным маркером скрытой HBV-инфекции.

Набор реагентов «Amplitech HBV» позволяет выявлять и количественно измерять ДНК HBV.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для качественного и количественного определения ДНК HBV в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Материалом для проведения ПЦР-исследования служат образцы ДНК, экстрагированной из плазмы крови человека.

Набор предназначен для лабораторной диагностики *in vitro* (выявление и количественное определение вируса гепатита В). Применение набора не зависит от популяционных и демографических аспектов.

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Набор предназначен для применения в клинической лабораторной диагностике для выявления и количественного определения вируса гепатита В. Отрицательные результаты исследования с помощью набора не исключают возможность инфицирования HBV и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациента. Отрицательные результаты исследования должны сочетаться с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

Набор может применяться в клинико-диагностических лабораториях.

3 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказания к применению набора отсутствуют.

4 РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ, ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ

При применении набора по назначению, в соответствии с данной инструкцией риски и побочные эффекты отсутствуют.

5 СОСТАВ

Состав набора¹ указан в таблице 1.

Таблица 1

Состав набора			
Компонент	Номинальный объем, мл	Кол-во	Внешний вид
Смесь-1 HBV (Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и ДНТФ)	0,96	1 пробирка	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета
Смесь-2 G (Буферный раствор с сульфатом магния, термостабильной ДНК-полимеразой)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ВК О (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с ДНК внутреннего контроля)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ОК (Буферный раствор)	4,8	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК1 HBV (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с фрагментом ДНК HBV)	4,8	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость

¹ Набор упакован в коробку из картона.

Компонент	Номинальный объём, мл	Кол-во	Внешний вид
ПК2 HBV (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с фрагментом ДНК HBV)	4,8	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	–	1 шт.	В бумажном виде и электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	–	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	–	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли.

6 ПРИНЦИП МЕТОДА

Исследование с помощью набора проводится методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Детекция продуктов ПЦР и отдельное выявление ДНК HBV и внутреннего контроля (ВК) обеспечивается применением в реакционной смеси для ПЦР флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, сигналы от которых регистрируются по различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 2).

Таблица 2

Каналы детекции мишеней

Канал детекции сигнала от флуорофора	Мишень	Область амплификации
R6G ³	ДНК HBV	Core protein
Sy5	ДНК ВК	Искусственно синтезированная последовательность

Линейная зависимость между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (порогового цикла, Ct) позволяет определять концентрацию ДНК HBV в образце относительно положительного контроля ПК1 HBV (образца с известной концентрацией ДНК-мишени), который проходит этап экстракции ДНК и ПЦР одновременно с исследуемыми образцами. Определение концентрации ДНК производится в соответствии с заданным значением концентрации ПК1 HBV и полученными значениями Ct для ПК1 HBV и исследуемых образцов.

6.1 Прослеживаемость значения положительного контроля ПК1 HBV

Концентрация клонированного фрагмента ДНК HBV в ПК1 составляет HBV 5 Ig ± 0,3 Ig ME/мл. Концентрация ПК1 HBV определяется с помощью установленной производителем методики выполнения измерений относительно стандартного образца предприятия (СОП) с аттестованным значением концентрации. Для определения концентрации СОП применяют набор реагентов для количественного

² В случае отсутствия доступа к Интернету обратитесь в службу технической поддержки по телефону (495) 374-13-46 для запроса о предоставлении бумажной версии паспорта.

³ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров Hex и Joe.

определения ДНК вируса гепатита В методом ПЦР в режиме «реального времени», зарегистрированный на территории РФ.

6.2 Характеристика положительного контроля ПК2 HBV

Концентрация клонированного фрагмента ДНК HBV в ПК2 HBV составляет $4 \text{ Ig} \pm 0,3 \text{ Ig ME/мл}$. Концентрация ПК2 HBV определяется с помощью установленной производителем методики выполнения измерений относительно ПК1 HBV с аттестованным значением концентрации.

7 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- центрифуга-вортекс (РУ № ФС № 2005/518);
- дозаторы переменного объёма, механические или электронные, с возможностью дозирования от 10 до 200 мкл (РУ № ФСР 2009/05681);
- программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФСЗ 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH; РУ № ФСЗ 2010/07595));
- штатив для пробирок объёмом 0,2 и 1,5 мл;
- холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С;
- пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл с оптически прозрачной крышкой, одноразовые, свободные от ДНКаз, при использовании амплификаторов планшетного типа;
- пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл с плоской крышкой, одноразовые, свободные от ДНКаз, при использовании амплификаторов роторного типа;
- пробирки объёмом 1,5 мл, одноразовые, свободные от ДНКаз, для приготовления реакционной смеси;
- наконечники для дозаторов переменного объёма, с фильтром, объёмом до 100 и 200 мкл, одноразовые, свободные от ДНКаз;
- ёмкость для сброса использованных материалов;
- перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.

8 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Класс потенциального риска применения набора (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ № 4н от 06.06.2012) – 3.

Работа должна проводиться в лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот для исследования материала, с соблюдением требований ГОСТ Р 52905 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV

групп патогенности», СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов исследования.

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами в соответствии с СанПиН 3.3686-21 (раздел IV).

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Утилизировать реагенты (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения) 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» к утилизации медицинских отходов класса Г.

- Не открывать пробирки с продуктами амплификации в процессе их сбора и утилизации.

- Утилизировать внешнюю упаковку набора, инструкцию по применению и краткое руководство в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 к утилизации медицинских отходов класса А.

- Утилизировать биологический материал, а также расходные материалы и инструменты, загрязнённые биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 к утилизации медицинских отходов класса В.

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию, указанному в таблице 1.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать отдельный для каждого образца/реагента одноразовый наконечник с фильтром.

- Использовать защитную одежду в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Все операции проводить только в одноразовых неопудренных перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

Реагенты, входящие в состав набора, содержат натрия азид в концентрации не более 0,05 %, поэтому не классифицируются как опасные для здоровья человека и окружающей среды. При контакте немедленно промыть поражённое место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

Использование набора по назначению и соблюдение вышеперечисленных мер предосторожности исключает негативное воздействие на организм человека.

9 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Набор предназначен для исследования только плазмы крови человека. Взятие, предварительную обработку, транспортирование и хранение биологического материала следует проводить в соответствии с:

- МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»;
- требованиями, перечисленными в таблице 3.

Таблица 3

Требования к взятию, предварительной обработке, условиям транспортирования и хранения исследуемого материала

Взятие и предобработка	Условия транспортирования и хранения
<p>Взятие цельной крови</p> <p>Взятие цельной крови провести натошак или через 3 ч после приёма пищи в пробирку с антикоагулянтом (раствором ЭДТА).</p> <p>ВНИМАНИЕ! Недопустимо использовать гепарин в качестве антикоагулянта.</p> <p>Тщательно перемешать кровь с антикоагулянтом, несколько раз перевернув пробирку.</p>	<p>При температуре от 2 °С до 8 °С не более суток.</p> <p>ВНИМАНИЕ! Недопустимо замораживание цельной крови.</p>
<p>Предобработка для получения плазмы</p> <p>Пробирки с цельной кровью центрифугировать 20 мин при 800–1600 x g при комнатной температуре. Затем отобрать плазму в количестве не менее 1 мл с использованием отдельного для каждого образца наконечника с фильтром в стерильные одноразовые пробирки.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • При температуре от 2 °С до 8 °С не более 5 суток; • При температуре минус 20 °С не более года; • При температуре минус 70 °С длительно; • Допускается однократное замораживание материала.

10 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

10.1 Экстракция ДНК

Провести экстракцию ДНК из исследуемого материала и контролей с использованием набора реагентов «НК-400» (ООО «Амплитек») согласно инструкции по его применению, с учётом требований к объёмам реагентов, указанных в таблице 4.

Требования к объемам реагентов при экстракции ДНК

Реагент	Объем реагента для одного образца
ВК О	10 мкл
Реагент для элюции ДНК	70 мкл при объеме образца 400 мкл/ 100 мкл при объеме образца 800 мкл

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК, ПК1, ПК2 не менее чем в одном повторе. Перед использованием контролей перемешать их и осадить капли на вортексе.

10.2 Подготовка к проведению ПЦР

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

10.2.1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами Смесь-1 HBV, Смесь-2 G и осадить капли на вортексе.

10.2.2 Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в отдельную пробирку в объемах согласно таблице 5. Перемешать и осадить капли на вортексе.

Таблица 5

Объемы компонентов реакционной смеси

Компонент	Объем компонента для одного образца, мкл	Примечание
Смесь-1 HBV	10	При расчёте объемов реагентов для общего количества исследуемых и контрольных образцов необходимо учитывать запас каждого реагента не менее чем на один образец.
Смесь-2 G	10	

10.2.3 Отобрать необходимое количество пробирок для проведения ПЦР с ДНК исследуемых образцов и контролей (ОК, ПК1 HBV, ПК2 HBV). Промаркировать.

10.2.4 Внести в пробирки по 20 мкл приготовленной реакционной смеси.

10.2.5 Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по 30 мкл образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей.

ВНИМАНИЕ! При внесении ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

10.3 Проведение ПЦР и детекции

10.3.1 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной в таблице 6.

Программа ПЦР и детекции

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	R6G ⁴ , Cy5	

Примечания

- 1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 50 мкл.
- 2) При одновременном проведении в одном приборе тестов только для выявления ДНК допускается исключить из указанной программы цикл «50 °С – 15 мин» для экономии времени.
- 3) Детекция может назначаться по другим каналам, помимо указанных, при одновременном проведении в одном приборе нескольких тестов с использованием указанной программы.

10.3.2 Поместить пробирки с реакционной смесью и элюатом в амплификатор и запустить программу.

Примечание – Перед постановкой в амплификатор планшетного типа рекомендуется осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

11 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- 11.1 Учёт результатов осуществляется с помощью программного обеспечения используемого амплификатора согласно инструкции по его применению. Рекомендуется выставлять пороговую линию на уровне 10 % от разгорания положительного контроля. Кривые флуоресценции, пересекающие пороговую линию, должны иметь сигмообразную форму.
- 11.2 Проверить наличие значений Ct для исследуемого образца по каналам R6G, Cy5.
- 11.3 При наличии значений Ct по каналу R6G рассчитать концентрацию ДНК HBV в международных единицах измерения в одном миллилитре (МЕ/мл) согласно формуле (1).

$$C_{\text{ДНК HBV}} = \frac{C_{\text{ПК1}}}{2^{(\Delta Ct - \Delta Ct_{\text{BK}})}} \quad (1)$$

где $C_{\text{ДНК HBV}}$ – концентрация ДНК HBV, МЕ/мл;

$C_{\text{ПК1}}$ – концентрация ДНК HBV в ПК1, МЕ/мл (значение концентрации указано в кратком руководстве для используемого лота набора);

ΔCt – разность между значением порогового цикла (Ct) для исследуемого образца и значением Ct для ПК1 по каналу R6G;

ΔCt_{BK} – разность между значением Ct для исследуемого образца и значением Ct для ПК1 по каналу Cy5.

⁴ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров Hex и Joe.

11.4 Провести интерпретацию результатов для исследуемых образцов согласно таблице 7.

Таблица 7

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат	Интерпретация
Качественное определение ДНК HBV	
По каналу Су5 значение Ct определено не больше граничного ⁵ . По каналу R6G значение Ct отсутствует.	ДНК HBV в образце <i>не выявлена</i> .
По каналу Су5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу R6G определено значение Ct.	В образце <i>выявлена</i> ДНК HBV.
По каналу Су5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналу R6G значение Ct отсутствует.	Невалидный результат
Количественное определение ДНК HBV	
По каналу Су5 значение Ct определено не больше граничного. По каналу R6G значение Ct отсутствует.	ДНК HBV в образце <i>не выявлена</i> .
Рассчитано значение концентрации ДНК HBV, укладывающееся в диапазон измерения набора.	ДНК HBV в образце <i>выявлена</i> в концентрации в пределах диапазона измерения набора.
Рассчитано значение концентрации ДНК HBV, не укладывающееся в диапазон измерения набора.	ДНК HBV в образце <i>выявлена</i> в концентрации вне пределов диапазона измерения набора.
По каналу Су5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналу R6G значение Ct отсутствует.	Невалидный результат

Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей 8.

Таблица 8

Критерии оценки для контролей

Контроль	Норма
ОК	По каналу Су5 значение Ct определено не больше граничного ⁵ . По каналу R6G значение Ct отсутствует.
ПК1	По каналам R6G, Су5 значение Ct определено не больше граничного.
ПК2	По каналам R6G, Су5 значение Ct определено не больше граничного. Рассчитанное значение ⁶ концентрации ПК2 укладывается в диапазон $\pm 0,5$ lg относительно значения, указанного в кратком руководстве для используемого лота набора.

12 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Рекомендации по устранению возможных ошибок, получаемых для исследуемых образцов и контролей в процессе исследования с помощью набора, указаны в таблице 9.

⁵ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве по применению набора.

⁶ Концентрация ПК2 рассчитывается по формуле (1), как для исследуемого образца.

Рекомендации по устранению ошибок

Ошибка	Возможная причина возникновения	Рекомендации по устранению
Для ПК1 значение Ct по каналу R6G и/или Су5 отсутствует или определено больше граничного ⁷ .	Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Для ПК2 значение концентрации определено вне заданного диапазона.		
Для ОК и/или ПК2 по каналу Су5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного.		
Для ОК по каналу R6G определено значение Ct.	Контаминация реагентов или исследуемых образцов продуктами амплификации.	Предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Невалидный результат для исследуемого образца (значение Ct по каналу Су5 отсутствует или определено больше граничного, по каналу R6G значения Ct отсутствуют).	Некорректное проведение экстракции ДНК. Наличие в образце ингибиторов ПЦР.	Повторить исследование данного исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторное взятие и исследование биологического материала.
Для исследуемого образца/контролей определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъёма (график представляет собой приблизительно прямую линию).	Некорректный выбор уровня пороговой линии или параметров расчёта базовой линии. Некорректное проведение ПЦР.	Проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчёта базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца или, в случае некорректного вида графика для контроля, амплификацию и детекцию для всех исследуемых образцов и контролей

13 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

13.1 Контроли, используемые в процессе исследования

Результаты исследования контролей должны соответствовать критериям оценки, указанным в разделе 11.

13.1.1 Отрицательный и положительные контроли

Каждая группа экстрагируемых образцов должна включать контрольные образцы:

- ОК для выявления контаминации в процессе проведения исследования;
- ПК1 HBV для контроля корректного прохождения исследования, а также для количественного определения ДНК HBV;
- ПК2 HBV для контроля корректности расчёта концентрации ДНК HBV.

⁷ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве по применению набора.

13.1.2 Внутренний контроль

Для контроля качества экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов на результаты амплификации используется экзогенный ВК, который добавляется на этапе экстракции ДНК в каждый исследуемый образец и контроли. Отсутствие результатов амплификации для ВК и одновременно для ДНК HBV свидетельствует о присутствии ингибиторов ПЦР в образце или некорректном проведении экстракции ДНК.

13.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Для выявления возможной контаминации лаборатории продуктами амплификации, исследуемыми и контрольными образцами рекомендуется раз в месяц исследовать смывы с рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений согласно процедуре, указанной в МУ 1.3.2569-09. При обнаружении контаминации необходимо провести мероприятия по её устранению согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09.

13.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований

Рекомендуется проводить контроль качества выполнения исследований с использованием панелей контрольных образцов, предназначенных для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по обнаружению и количественному определению ДНК HBV, либо сравнительным исследованием с использованием зарегистрированных в РФ наборов реагентов для качественного и количественного определения ДНК HBV в биологическом материале методом ПЦР.

14 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА⁸

14.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения набора составляет:

- 10 МЕ ДНК HBV в 1 мл исследуемого материала (95 % ДИ: 5,09–12,98 МЕ/мл) при экстракции из 400 мкл плазмы крови;
- 5 МЕ ДНК HBV в 1 мл исследуемого материала (95 % ДИ: 2,82–7,30 МЕ/мл) при экстракции из 800 мкл плазмы крови.

14.2 Диапазон измерения и предел измерения

Диапазон измерения набора составляет:

- от 30 до 1000000000 МЕ ДНК HBV в 1 мл исследуемого материала при экстракции из 400 мкл плазмы крови;
- от 15 до 1000000000 МЕ ДНК HBV в 1 мл исследуемого материала при экстракции из 800 мкл плазмы крови.

Предел измерения набора совпадает с нижней границей диапазона измерения набора.

⁸ Заявленные аналитические характеристики набора, кроме аналитической специфичности, проверены с использованием стандартных образцов предприятия, содержащих вектор со специфической последовательностью ДНК HBV.

14.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора оценивалась при тестировании микроорганизмов, указанных в таблице 10, и геномной ДНК человека. НК микроорганизмов исследовалась в концентрации не менее $1 \cdot 10^6$ копий/мл, геномная ДНК человека - в концентрации 1 мкг/мл. По итогам тестирования ложноположительных результатов выявлено не было.

Таблица 10

Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

Наименование	Наименование	Наименование
<i>Staphylococcus aureus</i>	CMV	HIV
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	EBV	HHV6
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	HAV	HSV 1 типа
<i>Streptococcus agalactiae</i>	HCV	HSV 2 типа
<i>Streptococcus pyogenes</i>	HDV	VZV

14.3.1 Потенциально интерферирующие вещества

Потенциально интерферирующие вещества (ингибиторы ПЦР) и их максимальные концентрации в образце, для которых оценивалось их ингибирующее влияние на ПЦР, перечислены в таблице 11.

Таблица 11

Потенциально интерферирующие вещества

Интерферент	Активный компонент	Тип интерферента	Концентрация вещества в образце	Обоснование исследованной концентрации
Цельная кровь	Гемоглобин, холестерин, триглицериды	Эндогенная субстанция	10 % v/v	Объём в образце в условиях «наихудшего случая»
Гепарин	Гепарин	Антикоагулянт	0,15 МЕ/мл	Концентрация в вакуумной пробирке
ЭДТА-К2	ЭДТА-К2		0,5 мМ/мл	
Лайфферон®	Интерферон альфа-2b	Препараты, назначаемые при терапии гепатитов	500 МЕ/мл	Двукратное превышение максимальной терапевтической концентрации в плазме
Зеффикс®	Ламивудин		0,02 мг/мл	
Энтекавир Сандоз®	Энтекавир		0,1 мг/мл	

Наличие возможного ингибирующего эффекта оценивалось путём проведения процедуры экстракции ДНК⁹ из образцов биологического материала, в которые добавлялись потенциальные интерференты в концентрациях согласно таблице 11 и стандартный образец предприятия, содержащий ДНК HBV в концентрации 20 МЕ/мл. Далее с экстрагированными образцами проводили ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» с использованием набора реагентов «Amplitech HBV».

По результатам оценки было определено вещество (гепарин), ингибирующее ПЦР, а также показано, что влияние остальных испытанных веществ в концентрациях согласно таблице 11 на ПЦР, проводимую с использованием набора «Amplitech HBV», отсутствует.

⁹ Экстракция проводилась с использованием набора реагентов «НК-400» (ООО «Ампитек»).

14.4 Прецизионность измерения

Коэффициент вариации повторяемости CV_p значений концентрации, характеризующий внутрисерийную повторяемость измерений с использованием набора, не превышает 5 %.

Коэффициент вариации воспроизводимости CV_v значений концентрации, характеризующий межсерийную воспроизводимость измерений с использованием набора, не превышает 10 %.

14.5 Правильность измерения

Систематическая погрешность, характеризующая правильность измерения с использованием набора, не превышает 15 %.

14.6 Диагностические характеристики

Значения диагностической чувствительности (ДЧ) и диагностической специфичности (ДС) набора с доверительной вероятностью 95 % указаны в таблице 12.

Таблица 12

Диагностические характеристики

Объём образца при экстракции, мкл	Количество образцов		ДЧ, %	ДС, %
	положит.	отрицат.		
400	100	100	97,0 – 100	97,0 – 100
800	100	100	97,0 – 100	97,0 – 100

14.7 Корреляция

Корреляция экспериментальных значений концентраций, полученных при исследовании образцов биологического материала с использованием набора реагентов «Amplitech HBV» и референтного набора реагентов, представлена на рисунке 1.

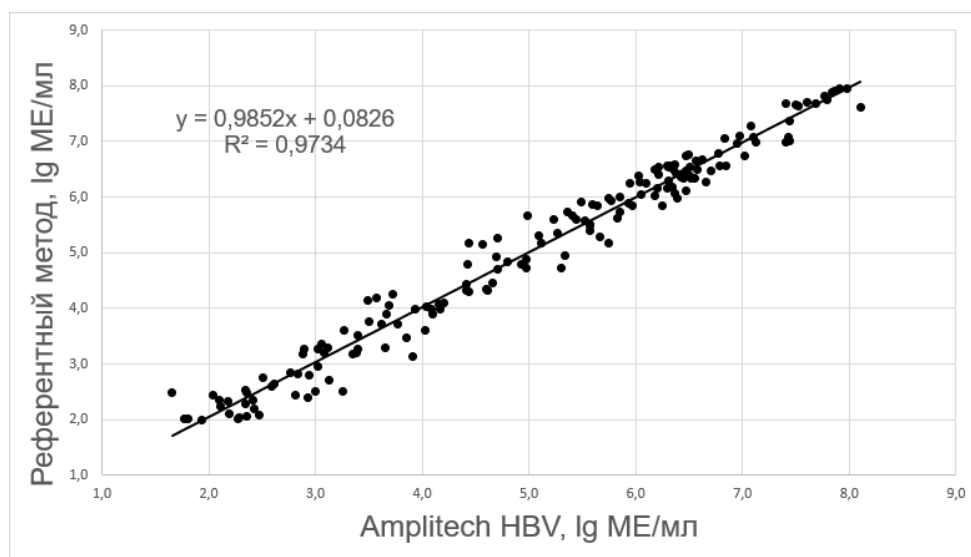


Рисунок 1

15 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

15.1 Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления.

После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора.

15.2 Хранение

Набор хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от солнечного света месте.

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

15.3 Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 °С до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах.

15.4 Эксплуатация

Реагенты, входящие в состав набора, готовы к использованию.

Повторное применение использованных для исследования реагентов не допускается.

Исследование образцов с использованием набора должно проводиться при температуре от 18 °С до 25 °С и относительной влажности воздуха от 25 % до 75 %.

16 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применены следующие сокращения:

Сt	– cycle threshold (пороговый цикл)
в.	– версия
ВК	– внутренний контроль
ДИ	– доверительный интервал
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазa	– дезоксирибонуклеаза
ОК	– отрицательный контроль
ПК	– положительный контроль
ПЦР	– полимеразная цепная реакция

17 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

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 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний

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

18 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении условий его транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора направлять в адрес производителя: ООО «Амплитек», 109235, Москва, ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42, тел. (495) 374-13-46, e-mail: support@amplitech.ru.

Сообщения о неблагоприятных событиях (инцидентах), возникших при работе с набором и не указанных в данной инструкции, следует направлять производителю по указанному выше адресу и в уполномоченный регуляторный орган согласно действующему законодательству.

19 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Консультацию по вопросам по работе с набором и его качеству можно получить по контактам, указанным на официальном сайте производителя: www.amplitech.ru.

20 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Изготовитель



Номер по каталогу



Дата изготовления



Код серии



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Использовать до



Обратитесь к инструкции по применению



Предел температуры



Содержимого достаточно для проведения n тестов



Не допускать воздействия солнечного света



Общество с ограниченной ответственностью «Амплитек»
(ООО «Амплитек»),
Россия, 109235, Москва,
ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42
тел. (495) 374-13-46, www.amplitech.ru,
e-mail: support@amplitech.ru