



751 2025-08-27



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для количественного определения
ДНК вируса гепатита В (HBV)
методом ПЦР в режиме реального времени

HBV Количественный

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2025/26078 от 21 августа 2025 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

HBV	- от англ. Hepatitis B virus
HBV WHO IS	- от англ. 4th WHO International Standard – 4й международно признанный калибратор производства NIBSC (первичный стандарт)
ВГВ	- вирус гепатита В
ВК	- внутренний контроль
ДИ	- доверительный интервал
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы	- дезоксирибонуклеазы
ДНК-ВК	- внутренний контрольный образец (ДНК-ВК)
ИВ	- интерферирующие вещества
К-	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
НК	- нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК)
ОТ	- обратная транскрипция
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РНКазы	- рибонуклеазы
СП HBV	- панель вторичных стандартов
СТ	- калибровочные образцы (СТ1 и СТ2)

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита В (HBV) является одним из основных этиологических агентов, вызывающих вирусный гепатит. HBV вызывает острое и хроническое заболевание печени и эндемичен во многих регионах мира. Хроническая инфекция, вызываемая вирусом гепатита В, является основной причиной цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы во всем мире, приблизительно 50–80% всех случаев гепатоцеллюлярной карциномы обусловлены хроническим гепатитом В. Вирус передается через контакт с кровью или другими жидкостями тела от инфицированного человека.

По оценкам ВОЗ, в мире приблизительно 400 миллионов человек живут с хронической инфекцией HBV, при этом ежегодно происходит около 1,5 миллиона новых случаев инфицирования. HBV распространен повсеместно, однако наибольшее количество новых случаев инфицирования наблюдается в странах Африки, Юго-Восточной Азии и Западно-Тихоокеанском регионе [1]. Количество смертей от связанных с HBV болезней печени оценивается в 886,000 ежегодно [2, 3]. Природный резервуар вируса неизвестен.

В качестве диагностических и/или прогностических индикаторов острого или хронического HBV инфекции обычно используются серологические маркеры [4]. HBV содержит 3 антигена: HBsAg (поверхностный антиген), HBcAg (коровый (core) антиген) и HBeAg (внутренний антиген). Однако некоторые штаммы HBV несут мутации ускользания в детерминанте антигена HBsAg и HBeAg, что ограничивает использование этих маркеров для мониторинга заболевания [5].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) установила базовые целевые показатели для диагностики – 30 процентов людей, инфицированных HBV, к 2021 году, и 90 процентов к 2030 году [6].

В соответствии с современными рекомендациями ВОЗ для количественного определения ДНК HBV в сыворотке или плазме крови рекомендуется использовать ПЦР-амплификацию в режиме реального времени (кПЦР-РВ) [7, 8]. Целевая последовательность для детекции HBV находится в поверхностном гене S.

Эта область специфична для HBV и высококонсервативна среди генотипов от А до Н.

Список литературы

1. World Health Organization et al. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021: accountability for the global health sector strategies 2016–2021: actions for impact. – 2021.
2. Otta J.J., Stevens G.A., J. Groegerb, Wiersma S.T. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity *Vaccine* 30 (2012) 2212–2219.
3. World Health Organization: Hepatitis B vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2009; 40:405–420.
4. Kao JH. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008; 2(4):553–62.
5. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol* 2008; 48(2):335–52.
6. World Health Organization. *Global Hepatitis Report*. 2017.
7. Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, Dawson P, Heermann K, Heath A, et al. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* 2001; 80(1):63–71.
8. Pawlotsky JM, Dusheiko G, Hatzakis A, Lau D, Lau G, Liang TJ, et al. Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach. *Gastroenterology* 2008; 134(2):405–15.

1 ПРЕНАНАНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для количественного определения ДНК вируса гепатита В (HBV) методом ПЦР в режиме реального времени (HBV Количественный), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для количественного определения ДНК вируса гепатита В в биологическом материале человека (плазма крови, сыворотка крови) методом ПЦР в режиме реального времени.

1.3 Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.

1.4 Показания к проведению анализа:

– необходимость количественного определения ДНК вируса гепатита В.

Противопоказаний к применению нет.

1.5 Популяционные и демографические аспекты: применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.6 Область применения: набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

1.7 Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории: врач клинико-диагностической лаборатории, фельдшер-лаборант (медицинский лабораторный техник).

1.8 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF Q1-P614-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 15 мкл
ОТ-ПЦР-буфер "V"	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 810 мкл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
Внутренний контрольный образец ДНК-ВК "А" ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Калибровочный образец HBV-СТ1 (5×10 ⁷ МЕ/мл)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	360 мкл
Калибровочный образец HBV-СТ2 (5×10 ⁴ МЕ/мл)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	360 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

REF Q1-P614-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок	по 15 мкл
ОТ-ПЦР-буфер "V"	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 810 мкл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
Внутренний контрольный образец ДНК-ВК "А" ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Калибровочный образец HBV-СТ1 (5×10 ⁷ МЕ/мл)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	360 мкл
Калибровочный образец HBV-СТ2 (5×10 ⁴ МЕ/мл)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	360 мкл

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

Комплектность:

- Набор реагентов в одном из вариантов исполнения – 1 шт.;
- Инструкция по применению – 1 экз.;
- Вкладыш – 1 экз.;
- Паспорт – 1 экз.

¹ – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «K+», «Внутренний контрольный образец ДНК-ВК "А"» указывается как «ДНК-ВК "А"»

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов рассчитан на проведение 96 определений (не более 6 постановок), включая анализ неизвестных образцов, калибровочных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода

Метод: полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; количественный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации фрагментов ДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. Горячий старт обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Старт полимеразной цепной реакции происходит только при расплавлении парафина, что исключает неспецифическое связывание праймеров с ДНК-мишенью при более низких температурах. Помимо этого, после окончания реакции и остывания пробирок, парафин обеспечивает запечатывание реакционной смеси и дополнительную защиту от контаминации продуктами амплификации.

В состав набора реагентов включен внутренний контрольный образец ДНК-ВК "А", который добавляется в анализируемые образцы на стадии выделения ДНК и предназначен для оценки этапа выделения ДНК и качества прохождения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических продуктов амплификации. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации искомой ДНК HBV, включена флуоресцентная метка Rox. В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта внутреннего контрольного образца, входит флуоресцентный краситель Hex.

В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Для проведения количественной оценки ДНК HBV набор реагентов включает калибровочные образцы в двух концентрациях: HBV-СТ1 – $5,0 \times 10^7$ МЕ/мл и HBV-СТ2 – $5,0 \times 10^4$ МЕ/мл.

Использование калибровочных образцов позволяет построить калибровочную прямую, при помощи которой определяют концентрацию ДНК HBV в неизвестных образцах плазмы/сыворотки крови.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex/Vic	Rox	Cy5	Cy5.5
–	ВК*	ДНК HBV	–	–
* – внутренний контрольный образец ДНК-ВК "А"				

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация ДНК с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием набора реагентов HBV Количественный.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК вируса гепатита В, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать положительный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома HBV) по каналу детекции Rox.

Набор реагентов выявляет следующие генотипы HBV: А, В, С, D, Е, F, G, H. Возможность выявления генотипов А, В, С, D, была подтверждена в ходе клинических испытаний. Выявление генотипов Е, F, G, H было подтверждено *in silico* эПЦР.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК вируса гепатита В, при проведении амплификации программное обеспечение должно регистрировать отрицательный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома HBV) по каналу детекции Rox и положительный результат амплификации внутреннего контроля по каналу детекции Hex/Vic.

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена на панели нуклеиновых кислот следующих организмов: РНК вирусов HAV, HDV, HGV, HIV, HCV, ДНК вирусов EBV, CMV, а также ДНК человека в концентрации до $1,0 \times 10^8$ копий/мл образца. Перекрестные реакции для указанных организмов и вирусов зарегистрированы не были.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых/недостовверных) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта.

Максимальные концентрации ИВ, при которых не наблюдалось влияние на проведение обратной транскрипции и амплификации лабораторного контрольного образца и внутреннего контрольного образца ДНК-ВК "А", составили: триглицеридов – до 40 ммоль/л образца плазмы/сыворотки, гемоглобина – до 2,0 г/л, билирубина – до 340 мкмоль/л, общий белок 80 г/л.

Концентрации экзогенных веществ в образцах биоматериала (плазма/сыворотка крови), не оказывающие интерферирующего влияния на исследование методом полимеразной цепной реакции: ацикловир, атазанавир, рибавирин, рифампицин, изониазид, азитромицин – составляют не более трёхкратных максимальных терапевтических концентраций.

3.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения (при использовании наборов реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА, ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА и ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ производства ООО «ДНК-Технология ТС»):

- 4 МЕ/мл при выделении ДНК из 1000 мкл образца плазмы крови/сыворотки крови с использованием набора реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА;
- 5 МЕ/мл при выделении ДНК из 500 мкл образца плазмы крови/сыворотки крови с использованием набора реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА;
- 15 МЕ/мл при выделении ДНК из 250 мкл образца плазмы крови/сыворотки крови с использованием набора реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА;
- 4 МЕ/мл при выделении ДНК из 500 мкл образца плазмы крови/сыворотки крови с использованием набора реагентов ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА.
- 15 МЕ/мл при выделении ДНК из 250 мкл образца плазмы крови/сыворотки крови с использованием набора реагентов ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ;
- 40 МЕ/мл при выделении ДНК из 100 мкл образца плазмы крови/сыворотки крови с использованием набора реагентов ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ.

Предел обнаружения установлен путём анализа серийных разведений двух серий лабораторного контрольного образца (ЛКО).

3.4 Линейный диапазон измерения: $2,5 \times 10^1$ – $1,0 \times 10^9$ МЕ/мл при выделении из образца объёмом 250–1000 мкл; $1,0 \times 10^2$ – $2,5 \times 10^9$ МЕ/мл при выделении из образца объёмом 100 мкл.

3.5 Коэффициент вариации результатов (%CV) – не более 10% (для Log₁₀ концентрации ДНК HBV МЕ/мл).

3.6 Метрологическая прослеживаемость

К набору реагентов применяются требования метрологической прослеживаемости контрольных образцов (ГОСТ Р ИСО 17511-2022).

В качестве международно признанного калибратора использован 4 международный стандарт для вируса гепатита В NIBSC код 10/266 (4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT NIBSC code: 10/266).

Концентрация ДНК HBV в плазме/сыворотке крови (рутинная проба), выраженная в МЕ/мл, определяется с применением калибровочных образцов HBV-СТ1 (5×10^7 МЕ/мл) и HBV-СТ2 (5×10^4 МЕ/мл), охарактеризованных к 4-му международному стандарту для гепатита В NIBSC код 10/266.

Неопределённость измерения (U) концентрации ДНК HBV в плазме/сыворотке крови (для Log₁₀ концентрации ДНК HBV МЕ/мл) составляет 0,4.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Вирус HBV отнесен ко II группе патогенности. Класс потенциального риска применения набора реагентов: 3 (Приказ Минздрава России от 06.06.2012 N 4н).

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р ИСО 15190-2023, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Неизвестные образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька.

При работе с микроорганизмами I–IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СанПиН 3.3686-21 и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

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

Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II–III класса с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР (МУ 1.3.2569-09).

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергаются влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются 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».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасного компонента	Указание на риски
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Нет опасных веществ	–
ОТ-ПЦР-буфер "V"	Нет опасных веществ	–
Фермент Taq/RT	Нет опасных веществ	–
Внутренний контрольный образец ДНК-ВК "А"	Азид натрия менее 0,1%	Не классифицируется как опасный для здоровья человека и окружающей среды
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1%	Не классифицируется как опасный для здоровья человека и окружающей среды
Калибровочный образец HBV-СТ1 (5×10 ⁷ МЕ/мл)	Азид натрия менее 0,1%	Не классифицируется как опасный для здоровья человека и окружающей среды
Калибровочный образец HBV-СТ2 (5×10 ⁴ МЕ/мл)	Азид натрия менее 0,1%	Не классифицируется как опасный для здоровья человека и окружающей среды

При работе с набором реагентов следует использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключён.

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;
- по истечению срока годности набора реагентов.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор с детекцией в режиме реального времени¹;
- микроцентрифуга-вортекс;
- ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл (только для фасовки S, стрипы);
- холодильник с морозильной камерой;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл (для фасовки S, пробирки) или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл (для фасовки S, стрипы);
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 2,0 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объём жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- штатив для дозаторов;
- пробирки микроцентрифужные объёмом 2,0 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз;
- пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот:
 - Набор реагентов для выделения ДНК/РНК вирусов из крови (ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ) ООО «ДНК-Технология ТС», Россия;
 - Набор реагентов для выделения ДНК/РНК вирусов из крови с предварительным концентрированием (ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия;
 - Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот вирусов из крови с предварительным концентрированием (ПРОБА-НК-УЛЬТРА), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2022/16810.

¹ – далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже

Набор реагентов применяется с детектирующими амплификаторами планшетного и роторного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированными в установленном порядке в РФ и соответствующими следующим требованиям:

- обеспечивается работа с объемом реакционной смеси 50 мкл;
- обеспечивается работа с флуорофорами: Hex (Vic), Rox;
- подогреваемая крышка с температурой более 100 °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/с;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/с;
- точность поддержания и однородность температуры не более $\pm 0,4$ °С.

Для работы с набором реагентов валидированы следующие детектирующие амплификаторы:

- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм *М*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229, далее по тексту – «ДТпрайм»;
- Амплификатор детектирующий «ДТлайт» по ТУ 9443-003-96301278-2010 (модификация «ДТлайт *S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228, далее по тексту – «ДТлайт»;
- Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96), Био-Рад Лабораториз, Инк; США, РУ № ФСЗ 2008/03399, далее по тексту – CFX96;
- Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени, «Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.», Сингапур, РУ № РЗН 2019/8446, далее по тексту – Applied Biosystems QuantStudio 5.

По вопросам применения детектирующих амплификаторов, не указанных выше, требуется согласование с производителем набора реагентов.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют плазму крови/сыворотку крови, полученные из цельной периферической крови человека.

6.2 Общие требования

Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

Неправильное взятие биоматериала может привести к получению недостоверных результатов и, вследствие этого, необходимости его повторного взятия.

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 и СанПиН 3.3686-21.

6.3 Взятие материала на исследование

Взятие цельной периферической крови проводится в соответствии с инструкциями по применению наборов реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА, ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА и ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ.

6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала

Транспортирование и хранение образцов крови проводится в соответствии с инструкциями по применению наборов реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА, ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА и ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ.

6.5 Получение плазмы крови/сыворотки крови

Получение и хранение плазмы крови/сыворотки крови проводится в соответствии с инструкциями по применению наборов реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА, ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА и ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ВНИМАНИЕ! При выполнении исследований в клинической лаборатории серьезную опасность представляет риск кросс-контаминации между образцами на всех этапах работы, особенно при аликвотировании и выделении ДНК. Перекрестная контаминация высококопийным биоматериалом может приводить к появлению спорадических ложноположительных результатов.

Для предупреждения кросс-контаминации биоматериалом в лаборатории рекомендуется выполнение следующих правил:

1. Необходимо проводить визуальную оценку поступившего биоматериала и выбраковку всех образцов, если среди них есть пробирки с нарушенной герметичностью.
2. Обязательно выполнять постановку отрицательных контрольных образцов, начиная с этапа выделения ДНК, в каждом протоколе.
3. Использовать на всех этапах исследования наконечники с аэрозольными фильтрами.
4. Соблюдать методику выполнения исследования, открывать пробирки типа Эппендорф, не допуская касаний руки в перчатке внутренней части крышки пробирки.
5. При внесении реагентов не касаться наконечником края пробирки.

7.1 Выделение ДНК

Для выделения ДНК HBV из плазмы/сыворотки крови валидированы наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот вирусов из крови ПРОБА-НК-УЛЬТРА, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2022/16810; ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА и ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия.

Выделение НК проводят в соответствии с инструкцией по применению используемого набора реагентов.

ВНИМАНИЕ! Полученный препарат НК необходимо в течение двух часов использовать для постановки реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

Использование контрольных образцов на этапе выделения нуклеиновых кислот – Внутренний контрольный образец ДНК-ВК "А" (входит в состав набора реагентов)

Для исключения ложноотрицательных результатов исследования и контроля качества исследования обязательно добавление **внутреннего контрольного образца ДНК-ВК "А"** в анализируемые образцы на этапе выделения нуклеиновых кислот.

– Отрицательный контрольный образец (из состава наборов реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА, ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА и ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ)

Для исключения ложноположительных результатов исследования и контроля качества исследования обязательно использование **отрицательного контрольного образца**.

На этапе выделения нуклеиновых кислот следует обязательно подготовить отрицательный контрольный образец (отрицательный контрольный образец из состава наборов реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА, ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА или разбавитель

для контрольных материалов из состава набора реагентов ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ) и провести его через все этапы выделения одновременно с выделением ДНК из неизвестных образцов в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора реагентов.

Калибровочные образцы HBV-СТ1 и HBV-СТ2 (входят в состав набора реагентов)

Калибровочные образцы HBV-СТ1 и HBV-СТ2 необходимо провести через этап выделения нуклеиновых кислот.

Выделение ДНК HBV с использованием набора реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА

В случае выделения ДНК HBV с использованием набора реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА следует вносить ДНК-ВК "А" в объёме 10 мкл на образец.

Перед проведением выделения необходимо разбавить калибровочные образцы «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2» отрицательным контрольным образцом (из состава набора реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА).

- При выделении ДНК HBV из 1000 мкл неизвестного образца необходимо внести в пробирки, промаркированные «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2», по 20 мкл соответствующего калибровочного образца и 980 мкл отрицательного контрольного образца.
- При выделении ДНК HBV из 500 мкл неизвестного образца необходимо внести в пробирки, промаркированные «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2», по 20 мкл соответствующего калибровочного образца и 480 мкл отрицательного контрольного образца.
- При выделении ДНК HBV из 250 мкл неизвестного образца необходимо внести в пробирки, промаркированные «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2», по 20 мкл соответствующего калибровочного образца и 230 мкл отрицательного контрольного образца.

В случае смешанной постановки (включающей одновременный анализ образцов, выделенных из 1000 мкл, 500 мкл и 250 мкл) следует проводить выделение калибровочных образцов и отрицательного контрольного образца из 1000 мкл.

Каждая группа выделяемых образцов должна включать один отрицательный контрольный образец (К-), три калибровочных образца «СТ1», три калибровочных образца «СТ2» (таблица 2).

Выделение ДНК HBV с использованием набора реагентов ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА

В случае выделения ДНК HBV с использованием набора реагентов ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА следует вносить ДНК-ВК "А" в объёме 20 мкл на образец.

Перед проведением выделения необходимо разбавить калибровочные образцы «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2» отрицательным контрольным образцом (из состава набора реагентов ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА).

- При выделении ДНК HBV из 500 мкл неизвестного образца необходимо внести в пробирки, промаркированные «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2», по 20 мкл соответствующего калибровочного образца и 480 мкл отрицательного контрольного образца.

Каждая группа выделяемых образцов должна включать один отрицательный контрольный образец (К-), три калибровочных образца «СТ1», три калибровочных образца «СТ2» (таблица 2).

Выделение ДНК HBV с использованием набора реагентов ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ

В случае выделения ДНК HBV с использованием набора реагентов ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ следует вносить ДНК-ВК "А" в объёме 20 мкл на образец.

Перед проведением выделения необходимо разбавить калибровочные образцы «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2» разбавителем для контрольных материалов (из состава набора реагентов ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ).

– При выделении ДНК HBV из 250 мкл неизвестного образца необходимо внести в пробирки, промаркированные «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2», по 20 мкл соответствующего калибровочного образца и 230 мкл разбавителя для контрольных материалов.

– При малом объёме исследуемого материала возможно проведение выделения ДНК HBV из 100 мкл неизвестного образца. В этом случае необходимо внести в пробирки, промаркированные «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2», по 20 мкл соответствующего калибровочного образца и 80 мкл разбавителя для контрольных материалов.

В случае смешанной постановки (включающей одновременный анализ образцов, выделенных из 250 мкл и 100 мкл) следует проводить выделение калибровочных образцов и отрицательного контрольного образца из 250 мкл.

Каждая группа выделяемых образцов должна включать один отрицательный контрольный образец (К-), три калибровочных образца «СТ1», три калибровочных образца «СТ2» (таблица 2).

Таблица 2 – Пример маркировки пробирок для проведения выделения ДНК

Образцы плазмы/сыворотки №1–№6	«К-»	HBV-СТ1	HBV-СТ2
Пробирка №1	Пробирка «К-»	Пробирка «СТ1-1»	Пробирка «СТ2-1»
Пробирка №2		Пробирка «СТ1-2»	Пробирка «СТ2-2»
Пробирка №3		Пробирка «СТ1-3»	Пробирка «СТ2-3»
Пробирка №4			
Пробирка №5			
Пробирка №6			

7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
2. При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы», следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.2.1 Промаркируйте необходимое количество пробирок/стрипованных пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином:

- по одной пробирке для каждого неизвестного образца плазмы/сыворотки крови;
- три пробирки для калибровочного образца HBV-СТ1 «СТ1»;

- три пробирки для калибровочного образца HBV-СТ2 «СТ2»;
- одну пробирку для отрицательного контрольного образца «К-»;
- одну пробирку для положительного контрольного образца «К+».

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 6 постановок при условии переменного количества неизвестных образцов, 3 калибровочных образцов HBV-СТ1, 3 калибровочных образцов HBV-СТ2, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 6 неизвестных образцов. Для этого нужно промаркировать 6 пробирок для неизвестных образцов; 3 пробирки для «СТ1», 3 пробирки для «СТ2», одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 14.

7.2.2 Встряхните пробирки с ОТ-ПЦР-буфером "V" и ферментом Taq/RT на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.3 Приготовьте смесь ОТ-ПЦР-буфера "V" с ферментом Taq/RT. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

- 15 x (N+1) мкл ОТ-ПЦР-буфера "V";
- 0,5 x (N+1) мкл фермента Taq/RT,

где N – количество промаркированных пробирок с учетом «СТ1», «СТ2», «К-» и «К+».

Смесь можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного часа.

Пример:

Необходимо проанализировать 6 неизвестных образцов. Промаркированных пробирок – 14. Нужно приготовить смесь ОТ-ПЦР-буфера "V" с ферментом Taq/RT для 15 (14+1) пробирок, т.е. 225 мкл ОТ-ПЦР-буфера "V" + 7,5 мкл фермента Taq/RT.

ВНИМАНИЕ! При взятии фермента Taq/RT необходимо погружать наконечник не более чем на 1,0 мм и соблюдать правила дозирования вязких жидкостей. Тщательно смыть остатки фермента Taq/RT с наконечника пипетированием не менее 5 раз.

7.2.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ОТ-ПЦР-буфера "V" и фермента Taq/RT на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.2.5 Добавьте во все промаркированные пробирки (включая «К-» и «К+»), не повреждая слой парафина, по 15 мкл смеси ОТ-ПЦР-буфера "V" с ферментом Taq/RT. Неплотно прикройте пробирки/стрипы крышками.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ОТ-ПЦР-буфера "V" и фермента Taq/RT в пробирки со смесью для амплификации необходимо сразу же выполнить 7.2.6 – 7.2.12.

7.2.6 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК, калибровочных образцов и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирки с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкциях по применению наборов реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА, ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА и ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ.

2. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Необходимо закрывать пробирки/стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.7 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 20 мкл полученного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «СТ1», «СТ2», «К–» и «К+», препарат ДНК не вносится.

7.2.8 Внесите в пробирки, промаркированные «СТ1» и «СТ2» (3 шт. для каждого калибровочного образца), не повреждая слой парафина, по 20 мкл соответствующего калибровочного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

7.2.9 Внесите в пробирку, промаркированную «К–», не повреждая слой парафина, 20 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

7.2.10 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 20 мкл положительного контрольного образца.

7.2.11 Центрифугируйте пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

7.2.12 Установите все пробирки/стрипы в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР (7.2.13, 7.2.14).

7.2.13 Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:

Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, укажите соответствующие концентрации калибровочных образцов: для «СТ1» – $5,0 \times 10^7$, для «СТ2» – $5,0 \times 10^4$; отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.2.12) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

¹ – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А) или предоставляется производителем набора реагентов

7.2.14 Для детектирующих амплификаторов CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5: Укажите соответствующие концентрации калибровочных образцов: для «СТ1» – $5,0 \times 10^7$, для «СТ2» – $5,0 \times 10^4$ и проведите ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 50 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 4 и 5 соответственно.

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	47	15	0	1		Цикл
2	95	5	0	1		Цикл
3	95	0	10	50	√	Цикл
	59	0	20			
4	25 ¹	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96

№ блока (Step)	Температура, °C	Время, мин:сек	Количество циклов (повторов)
1	47	15:00	1
2	95	5:00	1
3	95	0:10	50
4	59 √	0:20	

√ – режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Hex, Rox) при 59°C

Таблица 5 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов Applied Biosystems QuantStudio 5²

Стадия	№ шага	Температура, °C	Время, мин:сек	Количество циклов (повторов)
Стадия удержания	1	47	15:00	1
	2	95	05:00	1
Стадия ПЦР	1	95	0:10	50
	2	59 √	0:25	

√ – сбор данных для необходимых флуорофоров (Rox, Vic (Hex)) включён

¹ – допускается хранение при температуре 10 °C

² – Тип эксперимента – Стандартная кривая. Допускается использовать быстрый режим запуска

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится детектирующим амплификатором автоматически во время амплификации.

9 АЛГОРИТМ УЧЁТА РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Учет результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression) и исключить из анализа первые 5 циклов (Analyze Date from Cycle 5 to 50).

9.3 При использовании детектирующего амплификатора Applied Biosystems QuantStudio 5 данные амплификации могут быть получены различными методами, например, базовый порог (Ct) или относительный порог (Crt). Следовательно, эти точки могут иметь разные аббревиатуры (Ct, Crt), но обрабатываются в дальнейшем одинаково. В настройках относительного порога (Crt) начальный цикл Crt «5». Интерпретация результатов амплификации внутреннего контроля ДНК-ВК (Vic) в таблице 6 соответствует относительному порогу (Crt).

9.4 При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5 необходимо проанализировать выбранные образцы и исключить из анализа лунки, сигнал в которых превышает фоновый сигнал прибора, но имеет линейный, а не S-образный характер.

9.5 При отсутствии сервисного программного обеспечения вычисление концентрации ДНК НВВ в образцах плазмы/сыворотки (C1) проводят по формуле:

$$C1 = C2 * k \quad (1),$$

C1 – концентрация ДНК в исходном образце плазмы/сыворотки;

C2 – концентрация ДНК, измеренная программным обеспечением прибора по калибровочной кривой, заданной калибровочными образцами СТ1 и СТ2;

k – коэффициент пересчета, рассчитываемый по формуле:

$$k = \frac{V1}{V2} \quad (2)$$

V1 – объём раствора калибровочного образца СТ, вносимого в отрицательный контрольный образец в ходе процедуры выделения ДНК (20 мкл);

V2 – объём плазмы/сыворотки, из которого проводили выделение ДНК (1000 мкл или 250 мкл при выделении ДНК с использованием набора реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА, либо 500 мкл при выделении ДНК с использованием набора реагентов ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА, либо 250 мкл или 100 мкл при выделении ДНК с использованием набора реагентов ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ).

ВНИМАНИЕ! Значение коэффициента k для расчёта концентрации:

- При выделении ДНК HBV из плазмы/сыворотки объёмом 1000 мкл $k = 0,02$.
- При выделении ДНК HBV из плазмы/сыворотки объёмом 500 мкл $k = 0,04$.
- При выделении ДНК HBV из плазмы/сыворотки объёмом 250 мкл $k = 0,08$.
- При выделении ДНК HBV из плазмы/сыворотки объёмом 100 мкл $k = 0,2$
- При вычислении концентрации положительного контрольного образца $k = 0,02$.

Пример вычисления:

1) Концентрация, измеренная программным обеспечением прибора CFX96 (первичные данные), составляет «**2,88E+07**» – значение C_2 в формуле (1).

Если выделение ДНК проводили из 1000 мкл, то $k = 0,02$, концентрация в исходном образце составляет **2,88*10⁷ x 0,02 = 576000** МЕ/мл или **5,76E+05** МЕ/мл.

Если выделение ДНК проводили из 500 мкл, то $k = 0,04$, концентрация в исходном образце составляет **2,88*10⁷ x 0,04 = 1152000** МЕ/мл или **1,15E+06** МЕ/мл.

Если выделение ДНК проводили из 250 мкл, то $k = 0,08$, концентрация в исходном образце составляет **2,88*10⁷ x 0,08 = 2304000** МЕ/мл или **2,30E+06** МЕ/мл.

Если выделение ДНК проводили из 100 мкл, то $k = 0,2$, концентрация в исходном образце составляет **2,88*10⁷ x 0,2 = 5760000** МЕ/мл или **5,76E+06** МЕ/мл.

2) Концентрация, измеренная программным обеспечением прибора ДТпрайм (первичные данные), составляет «**36300000**» – значение C_2 в формуле (1).

Если выделение ДНК проводили из 1000 мкл, то $k = 0,02$, концентрация в исходном образце составляет **36300000 x 0,02 = 726000** МЕ/мл или **7,26E+05** МЕ/мл.

Если выделение ДНК проводили из 500 мкл, то $k = 0,04$, концентрация в исходном образце составляет **36300000 x 0,04 = 1452000** МЕ/мл или **1,45E+06** МЕ/мл.

Если выделение ДНК проводили из 250 мкл, то $k = 0,08$, концентрация в исходном образце составляет **36300000 x 0,08 = 2904000** МЕ/мл или **2,90E+06** МЕ/мл.

Если выделение ДНК проводили из 100 мкл, то $k = 0,2$, концентрация в исходном образце составляет **36300000 x 0,2 = 7260000** МЕ/мл или **7,26E+06** МЕ/мл.

9.6 В случае смешанных постановок (например, включающих одновременный анализ образцов нуклеиновых кислот, выделенных из 1000 мкл, 500 мкл, 250 мкл и 100 мкл плазмы/сыворотки) необходимо выбрать объём для образцов, чей объём отличается от стандартного объёма выделения (стандартным является выделение ДНК HBV из 1000 мкл плазмы/сыворотки) и произвести вычисление концентрации ДНК HBV, применив соответствующий коэффициент (согласно 9.5).

10 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 5. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Таблица 6 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции			Интерпретация результата	
Rox*, в диапазоне, расчётная концентрация МЕ/мл		Hex/Vic Cp/Cq/Crt	Интерпретация результата	
Выделение из 250–1000 мкл	Выделение из 100 мкл		Выделение из 250–1000 мкл	Выделение из 100 мкл
Неизвестные образцы				
2,5x10 ¹ – 1,0x10 ⁹	1,0x10 ² – 2,5x10 ⁹	Не учитывается	Положительный результат с указанием вирусной нагрузки в образце (МЕ/мл)	
Менее 25	Менее 100	Не учитывается	Положительный результат с указанием	
			«менее 25 МЕ/мл» (без указания точного значения!)	«менее 100 МЕ/мл» (без указания точного значения!)
Более 1,0x10 ⁹	Более 2,5x10 ⁹	Не учитывается	Положительный результат с указанием	
			«более 1,0x10 ⁹ МЕ/мл» (без указания точного значения!)	«более 2,5x10 ⁹ МЕ/мл» (без указания точного значения!)
Не указан		≤35	Отрицательный результат, не обнаружена ДНК HBV	
Не указан		>35 либо не указан	Недостовверный результат	
Отрицательный контрольный образец				
Не указан		≤35	Отрицательный результат (концентрация не указана) Результаты постановки валидны	
Положительный контрольный образец				
2,0x10 ⁴ –2,0x10 ^{5**}		Не учитывается	Положительный результат с указанием концентрации ДНК в образце (МЕ/мл) Результаты постановки валидны	

* – линейный диапазон измерения зависит от объёма выделения образца – см 3.3
 ** – если в положительном контрольном образце определяемая концентрация выходит за рамки диапазона 2,0x10⁴ – 2,0x10⁵ МЕ/мл, необходимо повторить исследование

10.1 Недостовверный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в препарате нуклеиновых кислот, полученном из биологического материала; ошибками преаналитического этапа, неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР для этого образца, либо повторное взятие биологического материала у пациента (выполняется последовательно).

10.2 При получении положительного результата для отрицательного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

10.3 При получении недостоверного результата для положительного контрольного образца (несоответствие положительного контроля заявленному диапазону) результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

11 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

11.1 Транспортирование

11.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

11.1.2 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

11.1.3 Допускается транспортирование фермента Taq/RT в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С не более 5 суток.

11.1.4 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

11.2 Хранение

11.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в защищённом от света месте.

11.2.2 Фермент Taq/RT следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

11.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

11.3 Указания по эксплуатации

11.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

11.3.2 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

11.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

- все компоненты набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в защищённом от света месте;
- фермент Taq/RT следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

11.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

12 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

12.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

12.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

13 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

13.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

13.2 Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

14 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для однократного применения и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

15 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов
	Использовать до
	Код партии (серии)
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Номер по каталогу
	Изготовитель
	Не допускать воздействия солнечного света
	Нестерильно

16 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ ISO 14971-2021 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям

ГОСТ Р 2.105-2019 Единая система конструкторской документации. Общие требования к текстовым документам

ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство (СРПП). Медицинские изделия

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации

ГОСТ 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний

ГОСТ Р ИСО 15190-2023 Лаборатории медицинские. Требования безопасности

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2024 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2024 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального использования

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

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований, Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов

Примечание – 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.

17 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики, и другого лабораторного применения, и ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС» (ООО «ДНК-Технология ТС»), Россия.

Адрес производителя: 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

- ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.
- ООО «НПО ДНК-Технология», 142281, Московская обл., г.о. Серпухов, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru,

www.dna-technology.ru

Приложение А

Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»

- 1) Количество пробирок в тесте – 1;
- 2) Объём реакционной смеси – 50 мкл;
- 3) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	47	15	0	1		Цикл
2	95	5	0	1		Цикл
3	95	0	10	50		Цикл
	59	0	20		√	
4	25 ¹	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
-	ВК	ДНК HBV	-	-

¹ – допускается хранение при температуре 10 °С