



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

ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для количественного выявления ДНК
вируса гепатита В методом ПЦР-РВ
«НЕРА-В-тест-Q»**

ТУ 21.20.23-017-97638376-2019

Содержание

Список сокращений	3
Введение.....	3
1. Назначение.....	5
2. Принцип метода	5
3. Состав набора реагентов	8
4. Характеристики набора реагентов.....	10
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов	21
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	22
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов.....	24
8. Анализируемые образцы	25
9. Подготовка компонентов набора для исследования.....	29
10. Проведение анализа	30
11. Регистрация и интерпретация результатов.....	32
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов	36
13. Утилизация	37
14. Гарантийные обязательства, контакты	38
Приложение А	39

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
HBV	вирус гепатита В
ВКО	внутренний контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
КО-1	калибровочный образец № 1
КО-2	калибровочный образец № 2
КОЧ	контрольный образец для определения чувствительности
КОС	контрольный образец специфичности

Введение

Вирус гепатита В – потенциально опасная для жизни инфекция, может приводить к развитию хронической болезни печени и создавать высокий риск смерти. Оценка вирусной нагрузки гепатита В позволяет скорректировать терапию и проводить мониторинг её эффективности.

Целевой анализ: специфичный участок геномной ДНК вируса гепатита В (hepatitis B, HBV, ВГВ) – ген *P* (кодирующий ДНК-полимеразу) и ген *S* (кодирующий поверхностный антиген HBsAg), консервативный у всех известных подтипов (А, В, С, D, Е, F, G, H, I и J).

Научная обоснованность целевого анализа заключается в его специфичности (уникальности последовательности ДНК) в отношении генома вируса гепатита В.

Вирус гепатита В – представитель семейства гепаднавирусов (Hepadnaviridae). Геном представлен кольцевой молекулой ДНК. Основным патогенным фактором передачи вируса является кровь. Выявление его специфических фрагментов ДНК позволяет судить о наличии вируса гепатита В в исследуемом образце и оценить вирусную нагрузку, что необходимо для выбора противовирусной терапии и мониторинга её эффективности¹.

Область применения набора реагентов: клиническая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: подозрение на инфицирование вирусным гепатитом В и определение вирусной нагрузки у пациентов с выявленным вирусом гепатита В для выбора адекватной терапии и оценки её эффективности.

Противопоказания к применению: при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению не выявлены.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия: популяционных, демографических аспектов применения набора реагентов «HEPA-B-тест-Q» не выявлено.

Стерильность: изделие не стерильно.

¹ Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. World Health Organization, 2015. 134 p.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «HEPA-B-тест-Q» предназначен для качественного и количественного определения ДНК гена *P* (кодирующего ДНК-полимеразу) и гена *S* (кодирующего поверхностный антиген HBsAg) вируса гепатита В (hepatitis B, HBV, ВГВ) методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени в пробе ДНК, выделенной из плазмы крови К2-ЭДТА человека, у пациентов с подозрением на инфицирование вирусным гепатитом В и пациентов с выявленным вирусом гепатита В для выбора адекватной терапии и оценки её эффективности.

Функциональное назначение: полученные результаты могут использоваться для диагностики вирусного гепатита В, определения адекватной терапии и оценки её эффективности. Результаты учитываются в комплексной диагностике заболевания.

Потенциальные потребители медицинского изделия

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

2. Принцип метода

Метод

Аллель-специфическая полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенной из плазмы крови К2-ЭДТА человека.

Принцип определения

Количественное определение ДНК вируса гепатита В методом мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробе ДНК, выделенной из клинического материала, включает в себя три этапа:

1. Подготовка ПЦР;

2. ПЦР-амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;

3. Интерпретация результатов.

С пробами ДНК проводятся реакции амплификации специфических участков при помощи специфичных к ним праймеров в реакционном буфере.

В состав ПЦР-буфера входят все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты, урацил-ДНК-гликозидазу и оптимизированный буфер. Наличие фермента урацил-ДНК-гликозидаза препятствует получению ложноположительных результатов при контаминации продуктами амплификации, при этом фермент полностью инактивируется в процессе первого цикла денатурации ДНК и не препятствует амплификации продуктов текущей реакции.

В составе смесей олигонуклеотидов присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и гидролизуются (разрушаются) *Taq*-полимеразой, в результате чего разобщаются краситель и тушител, и происходит нарастание интенсивности флуоресценции по соответствующему диапазону оптического спектра. Это позволяет регистрировать накопление специфичного продукта амплификации путём измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

Набор содержит реагенты для определения высокоспецифичных участков (мишеней) геномной ДНК вируса гепатита В, а также внутреннего контрольного образца (ВКО) (табл. 1).

ВКО позволяет оценить качество и эффективность выделения ДНК и возможного наличия ингибиторов амплификации в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

Для построения калибровочной прямой, необходимой для определения концентраций геномной ДНК вируса гепатита В в исследуемом образце, используются калибровочные образцы КО-1 и КО-2.

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору	
FAM / Green	HEX / Yellow
ДНК вируса гепатита В	ВКО

Ограничения метода

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

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

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

Нарушение условий хранения при транспортировании образцов.

Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах исследования с использованием данного МИ. В диагностических целях результаты должны использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования другими тест-системами (например, определение концентрации HBsAg, анти-HBs с помощью иммуноферментного или иммунохемилюминесцентного анализа), применяемой терапией.

При очень низкой вирусной нагрузке (менее 47 МЕ/мл), которая может быть обусловлена применяемой противовирусной терапией или особенностями течения заболевания, возможно получение ложноотрицательных результатов. В этих случаях рекомендовано использование большего объёма клинического материала для выделения НК для понижения порога чувствительности тест-системы.

Время проведения реакции ПЦР составляет от 80 до 100 минут (без учета пробоподготовки), в зависимости от используемого амплификатора.

3. Состав набора реагентов

Набор реагентов «HEPA-B-тест-Q» выпускается в одной форме комплектации – «HEPA-B-тест-Q».

Количество анализируемых проб

Набор реагентов рассчитан на 96 реакций, что соответствует определению 88 исследуемых образцов (44 образца при условии постановки дублями), калибровочных образцов, отрицательных и положительных контрольных образцов при единичном запуске амплификатора на 96 лунок или 10 единичным постановкам исследуемых образцов с калибровочными, отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Состав набора реагентов

Таблица 2 – Состав набора реагентов «HEPA-B-тест-Q»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1.	ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2.	Смесь олигонуклеотидов	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 1 440 мкл
3.	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 50 мкл
4.	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1 000 мкл
5.	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 950 мкл
6.	КО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки по 1 500 мкл
7.	КО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки по 1 500 мкл

Примечание: эксплуатационная документация (инструкция по применению и паспорт качества) не входит в состав изделия, но входит в комплект поставки изделия. Набор реагентов, для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую парию изделия.

В состав ПЦР-буфера входят все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты, урацил-ДНК-гликозидазу и оптимизированный буфер.

Смесь олигонуклеотидов готова к использованию и содержит праймеры и зонды, предназначенные для выявления специфических мишеней – см. таблицу 1. Смесь олигонуклеотидов находится в 10% водном растворе ТЕ (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА), свободном от нуклеаз.

ПКО готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК вируса гепатита В с концентрацией 1886792 МЕ/мл и фрагмента генома бактериофага. ПКО находится в 10% ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА).

ОКО готов к использованию и представляет собой деионизованную воду, свободную от ДНКаз.

ВКО представляет собой плазмидную ДНК с синтетической вставкой амплифицируемого фрагмента ДНК генома бактериофага в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

КО-1 представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК вируса гепатита В с концентрацией 188 679 МЕ/мл в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА) (1 000 000 копий/мл).

КО-2 представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК вируса гепатита В с концентрацией 566 МЕ/мл в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА) (3 000 копий/мл).

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

4. Характеристики набора реагентов

4.1. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Технические и функциональные характеристики набора реагентов «HEPA-B-тест-Q»

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
1. Технические характеристики		
1.1. Внешний вид		
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
КО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
КО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-017-97638376-2019	Раздел 7, пункт 7.12
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-017-97638376-2019	Раздел 7, пункт 7.12
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-017-97638376-2019	Раздел 7, пункт 7.12
2. Функциональные характеристики		
2.1 Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM Ct \leq 30, HEX Ct \leq 30.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.2 Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM и HEX Ct $>$ 35 или не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует)	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.3 Прохождение реакции в пробирках с КОС	В пробирках с КОС по каналу FAM Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), а по каналу HEX Ct \leq 32.	Раздел 7, пункт 7.8.2

2.4 Прохождение реакции в пробирках с КОЧ	В пробирках с КОЧ по каналу FAM во всех повторах (не менее 4) $Ct \leq 35$ и при значении стандартного отклонения в повторах КОЧ не более 5%, а по каналу HEX $Ct \leq 32$.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.5 Тест на «линейность»	Коэффициент корреляции КО-1, КО-2 и стандартного образца (СО) не менее 0,98	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.6 Тест на прецизионность: коэффициент вариации (КВ) в условиях повторяемости	Коэффициент вариации St у повторов каждого калибровочного образца КО-1 и КО-2 в условиях повторяемости составляет не более 5%.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.7 Тест на правильность определения концентрации	Полученное значение концентрации ДНК вируса гепатита В должно соответствовать концентрации, приведённой в паспорте стандартного образца, с допуском $\pm 0,4 \lg$ концентрации.	Раздел 7, пункт 7.8.2

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

- контрольный образец для определения чувствительности (КОЧ), представляющий собой смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента геномной ДНК вируса гепатита В и фрагмента генома бактериофага в 10 % ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА) с концентрацией 250 копий в 1 мл каждой (~47 МЕ/мл).

- контрольный образец специфичности (КОС), представляющий собой смесь раствор геномной ДНК человека, выделенной из клеточной линии Jurkat с концентрацией 1 000 копий на 5 мкл (200 000 копий/мл).

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Набор реагентов «HEPA-B-тест-Q» специфичен по отношению к геномной ДНК гепатита В (hepatitis B, HBV, ВГВ) – ген *P* (кодирующий ДНК-полимеразу) и ген *S* (кодирующий поверхностный антиген HBsAg).

Подтверждена возможность обнаружения и количественного определения в равной степени различных генотипов HBV. При проведении тестирования с использованием международного стандартного 1st WHO International Reference Panel for Hepatitis B Virus Genotypes for Nucleic Acid Amplification Techniques -Based Assays PEI code 5086/08o во всех полученных значениях

коэффициент корреляции R^2 ожидаемой концентрации HBV и полученной концентрации $\geq 0,98$, что подтверждает возможность обнаружения и количественного определения испытуемым набором реагентов «HEPA-B-тест-Q» в равной степени различных генотипов (A, B, C, D, E, F, G) гепатита В. Максимальное отклонение средней концентрации (\log_{10} МЕ/мл) полученной набором реагентов «HEPA-B-тест-Q» в двух повторах для стандартных образцов составило $0,05 \log_{10}$ от \log_{10} концентрации, установленной в инструкции по применению к панели 1st WHO International Reference Panel for Hepatitis B Virus Genotypes for Nucleic Acid Amplification Techniques -Based Assays PEI code 5086/08.

4.2.2 Предел обнаружения

По результатам исследования предел обнаружения ДНК HBV в образцах плазмы крови К2-ЭДТА²:

- объемом **100 мкл** с частотой выявления 95 % для амплификатора ДТпрайм – 47,8 МЕ/мл (95%ДИ: 46,37–49,23), CFX 96 – 47,5 МЕ/мл (95%ДИ: 46,07–48,93), Rotor-Gene Q – 47,6 МЕ/мл (95%ДИ: 46,17–49,03), QuantStudio 5 – 47,8 МЕ/мл (95%ДИ: 46,37–49,23),

- объемом **1000 мкл** с частотой выявления 95% для амплификатора ДТпрайм – 4,79 МЕ/мл (95%ДИ: 7,36–10,22), CFX 96 – 4,20 МЕ/мл (95%ДИ: 6,77–9,63), Rotor-Gene Q – 5,13 МЕ/мл (95%ДИ: 7,70–10,56), QuantStudio 5 – 4,93 МЕ/мл (95%ДИ: 7,50–10,36).

4.2.3 Предел обнаружения при тестировании различных генотипов (A, B, C, D, E, F, G) HBV. Результаты исследования с использованием Международного стандарта 1st WHO International Reference Panel for Hepatitis B Virus Genotypes for Nucleic Acid Amplification Techniques -Based Assays PEI code 5086/08, состоящего из 15 образцов лиофилизированной HBV-положительной плазмы и охватывающего наиболее распространенные генотипы HBV: Образцы 1–3 (генотип A), Образцы 4–6 (генотип B), Образцы 7–9 (генотип C), пробы 10–12 (генотип D), проба 13 (генотип E), образец 14 (генотип F) и образец 15 (генотип G), подтвердили способность набора реагентов «HEPA-B-тест-Q» выявлять генотипы A, B, C, D, E,

² Для пересчета результатов в копии/мл рекомендуется воспользоваться коэффициентом: 1 МЕ/мл = 5,3 копии/мл.

F, G в концентрации ~47 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл, ~4,7 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 1000 мкл с верхним односторонним доверительным интервалом 95 %, превышающим ожидаемую частоту выявления 95 %.

4.2.4 Предел количественного определения. На основании результатов исследования предел количественного определения (LOQ) в образцах плазмы крови К2-ЭДТА³:

- объемом **100 мкл** с доверительной вероятностью 95% для амплификатора ДТпрайм – 142,8 МЕ/мл (95%ДИ: 141,3–144,2), CFX 96 – 142,5 МЕ/мл (95%ДИ: 141,0–143,9), Rotor-Gene Q – 142,5 МЕ/мл (95%ДИ: 141,0–143,9), QuantStudio 5 – 142,8 МЕ/мл (95%ДИ: 141,3–144,2).

- объемом **1000 мкл** с доверительной вероятностью 95% для амплификатора ДТпрайм – 14,2 МЕ/мл (95%ДИ: 12,7–15,6), CFX 96 – 14,4 МЕ/мл (95%ДИ: 12,9–15,8), Rotor-Gene Q – 14,5 МЕ/мл (95%ДИ: 13,0–15,9), QuantStudio 5 – 14,4 МЕ/мл (95%ДИ: 12,9–15,8).

4.2.5 Верификация предела количественного определения (LOQ) при тестировании различных генотипов (A, B, C, D, E, F, G) HBV. Результаты исследования с использованием Международного стандарта 1st WHO International Reference Panel for Hepatitis B Virus Genotypes for Nucleic Acid Amplification Techniques -Based Assays PEI code 5086/08, состоящего из 15 образцов лиофилизированной HBV-положительной плазмы и охватывающего наиболее распространенные генотипы HBV: Образцы 1–3 (генотип A), Образцы 4–6 (генотип B), Образцы 7–9 (генотип C), пробы 10–12 (генотип D), проба 13 (генотип E), образец 14 (генотип F) и образец 15 (генотип G), подтвердили предел количественного определения (LOQ) набора реагентов «HEPA-B-тест-Q» по отношению к генотип A, B, C, D, E, F, G в концентрации ~ 142 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл, ~14,2 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 1000 мкл с верхним односторонним доверительным интервалом 95 %, превышающим ожидаемую частоту выявления 95 %.

³ Для пересчета результатов в копии/мл рекомендуется воспользоваться коэффициентом: 1 МЕ/мл = 5,3 копии/мл.

4.2.6 Линейный диапазон измерения исследуемого набора реагентов «HEPA-B-тест-Q»:

- в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл: линейный диапазон от 142 МЕ/мл до $1,89 \cdot 10^7$ МЕ/мл, максимальное отклонение от линии регрессии не выше, чем $\pm 0,4 \log 10$.

- в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 1000 мкл: линейный диапазон от 14,2 МЕ/мл до $1,89 \cdot 10^6$ МЕ/мл, максимальное отклонение от линии регрессии не выше, чем $\pm 0,4 \log 10$.

4.2.7 Верификация линейного диапазона измерения при тестировании различных генотипов (A, B, C, D, E, F, G) HBV. Линейный диапазон измерения набора реагентов «HEPA-B-тест-Q» при тестировании генотипов A, B, C, D, E, F, G:

- в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл: линейный диапазон от 142 МЕ/мл до $1,89 \cdot 10^7$ МЕ/мл, максимальное отклонение от линии регрессии не выше, чем $\pm 0,4 \log 10$.

- в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 1000 мкл: линейный диапазон от 14,2 МЕ/мл до $1,89 \cdot 10^6$ МЕ/мл, максимальное отклонение от линии регрессии не выше, чем $\pm 0,4 \log 10$.

4.2.8 Метрологическая прослеживаемость контрольных образцов – ПК0, КО-1, КО-2, входящих в состав набора реагентов «HEPA-B-тест-Q» проведена с использованием Международного стандарта WHO International Standard 4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT NIBSC code: 10/266. Приписанная концентрация КО-1 составляет 188679 МЕ/мл, КО-2 – 566 МЕ/мл, ПК0 – 1886792 МЕ/мл.

На основе полученных результатов процесса калибровки и стандартизации можно заключить, что набор реагентов «HEPA-B-тест-Q» обеспечивает количественные значения для стандарта Международного стандарта WHO International Standard 4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT NIBSC code: 10/266, которые аналогичны ожидаемым значениям с отклонением не более $\pm 0,4 \log 10$ МЕ/мл (неопределённость).

4.2.9 Прецизионность в условиях повторяемости и воспроизводимости:

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

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

4.3. Характеристики клинической эффективности

4.3.1 Специфичность

Специфичность «Набора реагентов для количественного выявления ДНК вируса гепатита В методом ПЦР-РВ «НЕРА-В-тест-Q», производства ООО «ТестГен» определяли методом тестирования отрицательных по содержанию ДНК HBV образцов от индивидуальных доноров. Статус по отношению к ДНК вируса гепатита В в образцах был установлен Набором реагентов для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HBV-FL» по ТУ 9398-030-01897593-2012, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия (РУ № ФСР 2007/00585 от 27.02.2019).

В общей сложности тестировали 65 образцов плазмы крови К2-ЭДТА двумя лотами набора реагентов «НЕРА-В-тест-Q». 65 образцов плазмы крови К2-ЭДТА оказались отрицательными по содержанию ДНК HBV. При тестировании данной панели образцов специфичность теста «НЕРА-В-тест-Q» составила 100,0 % (при одностороннем 95%-м доверительном интервале 99,5 %).

Нижняя граница доверительного интервала специфичности с доверительной вероятностью 95 % была определена по методу Клоппера и Пирсона (Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper, C., & Pearson, E. (1934). The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial. *Biometrika*, 26(4), 404-413. doi:10.2307/2331986).

Для проведения ПЦР-исследования набором реагентов «НЕРА-В-тест-Q» были использованы амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

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

4.3.2 Аналитическая специфичность: проверка эффекта потенциально интерферирующих веществ

Перечень проверенных потенциально интерферирующих веществ приведен в разделе 8.3 Инструкции.

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

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

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

Прочие интерферирующие вещества в валидированных концентрациях интерферентов не оказывают влияния на результаты теста. Отрицательный результат в тесте «HEPA-B-тест-Q» был получен для всех отрицательных по содержанию ДНК HBV образцов, положительный результат был получен для всех положительных по содержанию ДНК HBV образцов. Кроме того, средний \log_{10} титра каждого HBV-позитивного образца, содержащего потенциально интерферирующие вещества, находился между $-0,02 \log_{10}$ и $0,04 \log_{10}$ среднего \log_{10} титра соответствующего положительного образца.

4.3.3 Аналитическая специфичность: проверка эффекта потенциально перекрестных реагентов.

Результаты показали, что при испытании 31 образца плазмы крови К2-ЭДТА от пациентов, в которых показано отсутствие ДНК вируса гепатита В (отрицательные образцы), но с подтвержденным наличием ДНК/РНК следующих микроорганизмов: ВИЧ-1 – 2 образца, аденовирус типа 5 – 3 образца, вирус варицелла зостер – 1 образец, цитомегаловирус – 2 образца, *Staphylococcus aureus* – 2 образца, вирус Эпштейна-Барр – 2 образца, вирус гепатита А – 1 образец, вирус гепатита С – 4 образца, Т-клеточный лимфотропный вирус человека 2 типа – 2 образца, вирус герпеса человека, тип 6 – 2 образца, папилломавирус человека – 3 образца, вирус простого

герпеса, 1 типа – 4 образца, вирус простого герпеса, 2 типа – 3 образца, перекрёстной реактивности не наблюдалось, неспецифических реакций выявлено не было.

Положительный результат был получен для всех положительных по содержанию ДНК HBV образцов. Кроме того, средний \log_{10} титра каждого HBV-позитивного образца, содержащего потенциально перекрестных реагентов, находился между $-0,06 \log_{10}$ и $0,05 \log_{10}$ среднего \log_{10} титра соответствующего положительного образца.

4.3.4 Аналитическая чувствительность: предел обнаружения (LOD) для генотипов от А до G

Клинические образцы и образцы панели международного стандарта 1st WHO International Reference Panel for Hepatitis B Virus Genotypes for Nucleic Acid Amplification Techniques -Based Assays PEI code 5086/08, содержащие ДНК HBV семи разных генотипов (А, В, С, D, E, F, G), разводили в плазме крови К2-ЭДТА до концентрации LoD для генотипа А, установленным производителем с использованием международного стандарта WHO International Standard 4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT NIBSC code: 10/266 (генотип HBV А), определенным на основании пробит- анализа 95 % частоты выявления LoD (47 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл, 4,7 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 1000 мкл.

Полученные результаты подтвердили способность набора реагентов «HEPA-B-тест-Q» выявлять генотипы А, В, С, D, E, F, G в концентрации 47 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл, 4,7 МЕ/мл в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 1000 мкл с верхним односторонним доверительным интервалом 95 %, превышающим ожидаемую частоту выявления 95 %.

4.3.5 Результаты определения межлотовой корреляции (плазма крови К2-ЭДТА человека).

Для определения межлотовой корреляции результатов измерений в клинических образцах в соответствии с международным руководством CLSI EP09-A3 строилась диаграмма рассеяния зависимой переменной X – концентрация ДНК HBV с использованием испытуемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления ДНК вируса гепатита В методом ПЦР-РВ «HEPA-B-тест-Q», производства ООО «ТестГен», LOT: 202111-

427, и У – концентрация ДНК HBV с использованием испытуемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления ДНК вируса гепатита В методом ПЦР-РВ «HEPA-B-тест-Q», производства ООО «ТестГен», LOT: 202111-428.

Результаты статистической обработки полученных данных по определению межлотовой корреляции в соответствии с рекомендациями документа CLSI EP09-A3 с использованием метода регрессии и корреляции

	Тип образца	Ед.изм	Используемый амплификатор	Кол-во проб	Коэфф. коррел.	Пересечение	Наклон
Набор реагентов «HEPA-B-тест-Q», производства ООО «ТестГен» LOT: 202111-427 в сравнении с Набором реагентов «HEPA-B-тест-Q», производства ООО «ТестГен» LOT: 202111-428	Плазма крови К2-ЭДТА человека	log10 МЕ/мл	ДТпрайм	55	0,9987	-0,0079	1,0013
			CFX 96	55	0,999	0,0426	0,9911
			Rotor-Gene Q	55	0,999	-0,0013	0,9995
			QuantStudio5	55	0,9989	0,0382	0,9919

Коэффициент корреляции R^2 при проведении анализа на каждом из используемых амплификаторов составил более **0,99**. В соответствии с рекомендациями документа CLSI EP09-A3 с использованием метода регрессии и корреляции можно сделать вывод о высокой силе корреляционной связи концентрации ДНК HBV в клинических образцах, полученных при помощи **двух лотов испытуемого МИ** «Набор реагентов для количественного выявления ДНК вируса гепатита В методом ПЦР-РВ «HEPA-B-тест-Q», производства ООО «ТестГен».

4.3.6 Сравнение методов: точность.

В 55 клинических образцах была определена концентрация ДНК HBV с использованием испытуемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления ДНК вируса гепатита В методом ПЦР-РВ «HEPA-B-тест-Q» в двух сериях с использованием амплификаторов, рекомендованных производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), регистрационное удостоверение № ФСР 2011/10228 от 03 марта 2011 г.;

- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США), регистрационное

удостоверение № ФСЗ 2008/03399 от 21 июня 2016 года;

- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010;

- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США), регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8446 от 06 июня 2019 года.

Полученные результаты сравнивались с результатами, полученными с использованием набора сравнения «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, (регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00584 от 27.08.2019).

Результаты статистической обработки полученных данных по сравнению методов (точность) в соответствии с рекомендациями документа CLSI EP09-A3 с использованием метода регрессии и корреляции

	Тип образца	Ед.изм	Используемый амплификатор	Кол-во проб	Кэфф. коррел.	Пересечение	Наклон
Набор реагентов «HEPA-B-тест-Q», производства ООО «ТестГен» в сравнении с набором реагентов «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, (ПУ № ФСР 2007/00584 от 27.08.2019)	Плазма крови К2-ЭДТА человека	log ₁₀ МЕ/мл	ДТпрайм	55	0,9998	0,0489	0,998
			CFX 96	55	0,9997	0,0383	1,0012
			Rotor-Gene Q	55	0,9997	0,0489	0,9974
			QuantStudio 5	55	0,9998	0,0469	0,9988

Полученные данные позволяют сделать вывод о достоверном соответствии результатов количественного определения концентрации ДНК HBV в клинических образцах, полученных с помощью **испытуемого МИ** «Набор реагентов для количественного выявления ДНК вируса гепатита В методом ПЦР-РВ «HEPA-B-тест-Q», производства ООО «ТестГен» и **набора сравнения** «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, (регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00584 от 27.08.2019).

Систематическая погрешность измерения логарифма концентрации ДНК HBV не превышает 3 %.

4.3.7 Определение сходимости (клинические образцы)

Сходимость (внутрисерийная воспроизводимость) испытуемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления ДНК вируса гепатита В методом ПЦР-РВ «HEPA-B-тест-Q» оценивалась посредством 10-кратного измерения двух образцов плазмы крови К2-ЭДТА человека с установленной концентрацией ДНК HBV из линейного диапазона измерения, с помощью зарегистрированного набора реагентов «АмплиСенс® HBV- Монитор-FL», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, (регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00584 от 27.08.2019) на амплификаторе Rotor- Gene Q («Qiagen», Германия, № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010).

Значения концентраций рассматривали как имеющие log-нормальное распределение и анализировали выраженными в log10.

Оценивались среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации. Сходимость считалась приемлемой, если коэффициент вариации не противоречил данным технической документации.

Коэффициент вариации (КВ) при определении сходимости результатов измерений ДНК HBV в образцах плазмы крови К2-ЭДТА человека, при помощи испытуемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления ДНК вируса гепатита В методом ПЦР-РВ «HEPA-B-тест-Q», не превышает заявленной производителем и составляет не более 3%.

4.3.8 Определение сходимости (калибровочные образцы КО-1 и КО-2)

Сходимость (внутрисерийная воспроизводимость) калибровочных образцов в составе испытуемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления ДНК вируса гепатита В методом ПЦР-РВ «HEPA-B-тест-Q» оценивалась посредством 10-кратного измерения каждого уровня калибровочных образцов КО-1 и КО-2 в одной аналитической серии.

Полученные результаты свидетельствуют об адекватной работе аналитической системы. По полученным результатам можно заключить, что коэффициент вариации (КВ) при определении сходимости результатов калибровочных образцах двух уровней КО-

1 и КО-2 не превышает заявленной производителем и составляет не более 2 %.

4.3.9 Определение воспроизводимости (калибровочные образцы КО-1 и КО-2)

Воспроизводимость калибровочных образцов КО-1 и КО-2 в составе испытуемого МИ «Набор реагентов для количественного выявления ДНК вируса гепатита В методом ПЦР-РВ «НЕРА-В-тест-Q» оценивалась посредством измерений каждого уровня калибровочных образцов КО-1 и КО-2 в 10 дополнительных аналитических сериях.

Данные по воспроизводимости получают при тестировании различных партий набора реагентов, реакции ставят в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах.

Полученные результаты свидетельствуют об адекватной работе аналитической системы в условиях воспроизводимости: при тестировании различных партий набора реагентов, в разных лабораториях, разными операторами, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах.

По полученным результатам можно заключить, что коэффициент вариации (КВ) при определении воспроизводимости результатов на калибровочных образцах двух уровней КО-1 и КО-2 не превышает заявленной производителем и составляет не более 3%.

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. Потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
2. Загрязнение клинического материала ингибирующими веществами в концентрациях, превышающих допустимые;
3. Контаминация реакционных смесей и образцов исследуемой ДНК содержимым из пробирки ПКО или продуктами амплификации;
4. Проведение анализа с использованием пробы ДНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);

5. Невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированного персонала;

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

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для количественного выявления ДНК вируса гепатита В методом ПЦР-РВ “НЕРА-В-тест-Q”» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

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

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

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

Реагенты, входящие в набор «НЕРА-В-тест-Q», не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работу с материалом, заражённым или подозрительным на заражённость, проводят в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения

контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

– удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов;

– применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

– допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по

работе с ПБА I–II групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также лаборант со средним специальным медицинским образованием);

- не использовать набор по истечении срока годности;
- избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой;

при контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Работа с набором реагентов осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Вортекс;
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объёма;
4. Холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой не выше -16 °С;
5. Амплификатор⁴ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green и HEX/Yellow: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

⁴ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free».

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, Ахуген, США);

2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 или 2,0 мл;

3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) или оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенку пробирки) для ПЦР: пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл⁵, или пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, Ахуген, США), совместимые с используемым амплификатором;

4. Халат и одноразовые перчатки без талька;

5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл;

7. Набор для выделения ДНК из плазмы крови К2-ЭДТА (см. п. 8.2 Инструкции).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенной из плазмы крови К2-ЭДТА человека.

8.1. Процедура получения клинического материала

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012.

Забор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала,

⁵ Убедитесь в совместимости пробирок для ПЦР с используемым амплификатором.

подозрительного на зараженность микроорганизмами II группы патогенности.

Забор материала на исследование

Взятие периферической крови проводится утром натощак в пробирку (вакуумную пробирку), содержащую раствор ЭДТА-К2 в качестве антикоагулянта, объёмом 4 или 6 мл. Сразу после взятия крови пробирку перевернуть 3–4 раза для перемешивания крови с раствором ЭДТА-К2.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина и цитрата натрия в качестве антикоагулянта.

Условия транспортирования и хранения исходного клинического материала – крови:

– при температуре от +2 °С до +8 °С – не более 6 часов;

– при комнатной температуре – не более 2 часов.

Кровь не замораживать.

В течение 2 часов (при хранении при комнатной температуре) или 6 часов (при хранении при температуре от +2 °С до +8 °С) после забора материала следует отобрать плазму К2-ЭДТА, для чего пробирку с кровью центрифугируют при 800–1600 g в течение 20 минут при комнатной температуре. После центрифугирования верхнюю фракцию (плазму) перенести в отдельные пластиковые пробирки объёмом 1,5 или 2,0 мл, свободные от ДНКаз.

Условия транспортирования и хранения плазмы крови К2-ЭДТА:

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

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

Для выделения ДНК использовать не менее 100 мкл плазмы. Повышение аналитической чувствительности набора возможно благодаря использованию большего объёма плазмы К2-ЭДТА, если это предусмотрено используемым набором для выделения ДНК.

Предварительная обработка материала

Подготовка не требуется.

Учёт, хранение, передача и транспортирование клинического материала, подозрительного на наличие вируса гепатитов, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-

эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13), действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности.

Утилизация клинического материала (класс В), как чрезвычайно эпидемиологически опасных отходов, осуществляется в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

8.2 Процедура получения пробы ДНК человека, выделенной из плазмы крови К2-ЭДТА

Для выделения пробы ДНК человека из плазмы крови К2-ЭДТА рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

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

Во время процедуры выделения ДНК необходимо строго соблюдать протокол и требования инструкции применяемого набора реагентов.

К объёму плазмы К2-ЭДТА, предназначенной для выделения ДНК, следует добавить 10 мкл ВКО из набора реагентов «НЕРА-В-тест-Q».

Через этап выделения с добавлением 10 мкл ВКО проходят также ОКО и калибровочные образцы КО-1 и КО-2 в объёме 100 мкл (при проведении качественного анализа использование КО-1 и КО-2 не требуется). Если инструкцией производителя наборов реагентов для выделения ДНК предусмотрено использование большего объёма образца, следует довести объём ОКО, КО-1 и КО-2 до требуемого физиологическим раствором или ТЕ-буфером.

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК

- при температуре от 2 до 8°C – не более суток (24 ч),
- при температуре от -18 до -22°C – не более месяца,
- при -80°C – длительно.

8.3. Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «HEPA-B-тест-Q» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «HEPA-B-тест-Q», и, предположительно, влиять на способность набора реагентов выдавать достоверные результаты.

Интерферирующие вещества могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);

2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение клинического образца гемоглобином крови может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения ДНК;

3) вещества, встречающиеся при процедуре забора клинического материала – в данном случае, антикоагулянты.

Исследованные концентрации интерферирующих веществ, которые приведены в таблице 6.

Таблица 6

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества и антикоагулянты	
Гемоглобин	260 мкг/мл
Гепарин (антикоагулянт)	0,15 МЕ/мл
Цитрат натрия (антикоагулянт)	0,1 мМ/мл
ЭДТА-К2 (антикоагулянт)	0,5 мМ/мл
Холестерин	150 мг/дл
Триглицериды	250 мг/дл
Экзогенные интерферирующие вещества	
При антикоагулянтной терапии	
Гепарин	1 МЕ/мл
Препараты, назначаемые при вирусном гепатите В	
Интерферон альфа	1000 МЕ/мл
Пегилированный интерферон альфа	0,036 мкг/мл
Ламивудин	0,02 мг/мл

Энтекавир	0,1*10 ⁻³ мг/мл
Телбивудин	0,12 мг/мл

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

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

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

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

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность);

- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом

- наличие гепарина в крови у пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии, может привести к получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови у таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

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

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

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа ДНК, ПЦР-буфером, смесью олигонуклеотидов, КО-1, КО-2, ОКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием (при проведении качественного анализа использование КО-1 и КО-2 не требуется).

2. Отобрать необходимое количество пробирок (с оптически прозрачными крышками или стенками – в зависимости от используемого типа детектирующего амплификатора) объёмом 0,1 или 0,2 мл для ПЦР из расчёта: количество исследуемых образцов⁶ + 1 x ПКО + 1 x ОКО + 3 x КО-1 + 3 x КО-2 (при проведении качественного анализа использование КО-1 и КО-2 не требуется).

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

1. Подготовка ПЦР;

2. ПЦР-амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;

3. Интерпретация результатов (подробно описано в главе 11).

А) Подготовка ПЦР

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

Общий объём реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции.

⁶ Для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец в двух повторах.

Для приготовления реакционной смеси на 1 реакцию необходимо:

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

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл для ПЦР.
2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объёмом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: $(n+9) \times 5$ мкл ПЦР-буфера и $(n+9) \times 15$ мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов.
3. В каждую пробирку для ПЦР внести по 20 мкл приготовленной реакционной смеси.
4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 5 мкл выделенной ДНК. В пробирки для ПКО и ОКО препарат ДНК не вносится.
5. В соответствующие пробирки для КО-1 и КО-2 добавить по 5 мкл калибровочных образцов, прошедших через этап выделения ДНК (см. п. 8.2) (при проведении качественного анализа использование КО-1 и КО-2 не требуется).
6. Внести в соответствующую пробирку 5 мкл ПКО.
7. Внести в соответствующую пробирку 5 мкл ОКО, прошедших через этап выделения ДНК (см. п. 8.2).
8. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Б) ПЦР-амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени

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

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

Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Тип анализа:

количественный со стандартами. Протокол ПЦР указан в таблице 7.

2. Для количественного анализа: указать количество и идентификаторы образцов, стандартов КО-1 и КО-2 с указанием их концентраций, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

3. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green и HEX/Yellow.

4. Запустить ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

5. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

Таблица 7 – Протокол ПЦР

Стадия	Температура, °С	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	02:00	–	–
2	95	00:05	–	5
	60	00:15	–	
	67	00:30	–	
3	95	00:05	–	45
	60	00:15	FAM/Green, HEX/Yellow	
	67	00:30	–	

При необходимости одновременной постановки тестов совместно с наборами реагентов «HEPA-BSD-тест», «HEPA-C-тест-Q», «HEPA-C-ГЕН-тест» и «HEPA-D-тест-Q» возможно добавление предварительного этапа 52 °С – 40 минут в начале протокола, что соответствует этапу обратной транскрипции.

11. Регистрация и интерпретация результатов

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

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала детекции на уровне, соответствующем 5–20% от максимального уровня

флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям Ct каналов FAM/Green и HEX/Yellow (табл. 1). Учитываются только значения Ct, полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 3 – см. табл. 7).

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

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификаторов Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene Q и аналогичных, активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal).

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для ОКО и ПКО должны быть получены следующие результаты (табл. 8).

Таблица 8 – Результаты исследования для ОКО и ПКО

Контрольный образец	Значения Ct по каналам детекции, соответствующим флуорофорам	
	FAM/Green	HEX/Yellow
ОКО	> 35 или отсутствует	≤ 32
ПКО	≤ 30	≤ 30

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 8, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 8, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 8, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

Интерпретация результатов проводится автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого вместе с используемым детектирующим амплификатором, или вручную. На основании полученных значений C_t для калибровочных образцов и их концентраций необходимо произвести построение калибровочной прямой. При использовании калибровочной прямой производится вычисление концентраций анализируемых образцов.

ДНК гепатита В обнаружена, если по каналу FAM $C_t \leq 35$. При получении для образцов $C_t > 35$ по каналу FAM при $C_t \leq 32$ по каналу HEX результат считается сомнительным. ДНК гепатита В не обнаружена, если C_t по каналу FAM отсутствует, а по HEX $C_t \leq 32$. Результат считается невалидным, если по каналу FAM $C_t > 35$ или отсутствует, а по HEX $C_t > 32$ или отсутствует. Количественный анализ возможен при выявлении ДНК гепатита В у образца.

Эффективность ПЦР должна быть в диапазоне от 90% до 110%, разница между значениями C_t у повторов каждого калибровочного образца, КО-1 и КО-2, должна быть не более 1. В противном случае необходимо заново провести анализ, начиная с этапа выделения ДНК. В случае, если один из трёх дублей КО-1 или КО-2 имеет резко отклоняющееся от остальных значение C_t , допускается его игнорирование при построении калибровочной прямой.

Если для экстракции ДНК использовался объём плазмы К2-ЭДТА, превышающий 100 мкл (при сохранении объёма калибровочных образцов, взятых для выделения ДНК), следует произвести пересчёт полученной концентрации ДНК гепатита В: умножить полученное значение концентрации на соотношение $100/V$, где V – используемый объём плазмы К2-ЭДТА для выделения ДНК. Точность измерений: $\pm 0,4 \lg$ концентрации.

Дальнейшие принципы интерпретации результатов отражены в таблице 9.

Причиной получения невалидного результата может служить присутствие ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала, неверное выполнение протокола анализа, несоблюдение температурного режима ПЦР и др.

Причиной получения сомнительного результата может служить недостаточная концентрация вируса в клиническом образце.

Таблица 9 – Принцип интерпретации результатов в исследуемых клинических образцах

Каналы, соответствующие флуорофорам		Интерпретация результата
FAM/Green (HBV), МЕ/мл	HEX/Yellow (ВКО), Ct	
142 – 1,89*10 ⁷ МЕ/мл	не уч.	положительный результат с указанием конкретной концентрации в МЕ/мл
< 142 МЕ/мл	не уч.	положительный результат с указанием «менее 142 МЕ/мл» (менее 750 копий/мл)
> 1,89*10 ⁷ МЕ/мл	не уч.	положительный результат с указанием «более 1,89*10 ⁷ МЕ/мл» (более 100 000 000 копий/мл)
–	≤ 32	отрицательный результат (концентрация не указана)
–	–	невалидный результат

Обозначения: «не уч.» – результат при интерпретации не учитывается; «–» – сигналфлуоресценции отсутствует, концентрация не указана.

Примечание: в таблице приведены значения для выделения ДНК из объёма 100 мкл; при выделении из 1000 мкл значения концентраций будут в 10 раз меньше указанных.

В случае невалидного и сомнительного результата заключение не выдаётся, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ. При этом для сомнительных результатов рекомендуется проведение выделения ДНК из большего объёма плазмы К2-ЭДТА.

При повторении сомнительного результата повторить исследование набором реагентов другого производителя или другим методом.

Для пересчета результатов в копии/мл рекомендуется воспользоваться коэффициентом: 1 МЕ/мл = 5,3 копии/мл⁷.

⁷ Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. World Health Organization, 2015. 134 p.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

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

Допускается заморозка/оттаивание набора «НЕРА-В-тест-Q» не более 10 раз.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов «НЕРА-В-тест-Q» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Транспортировать при температуре от -18 до -22 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8 °С до 30 суток, или при температуре от 15 до 25 °С не более 5 суток.

Атмосферное давление не контролируется, так как не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объём и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объём термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

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

Срок годности

Срок годности набора реагентов «НЕРА-В-тест-Q» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истёкшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

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

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

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

13. Утилизация

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

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 170 СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета (кроме жёлтого и красного).

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

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента

водопроводной водой 1 : 100 и вывозом остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

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

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

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует качество и безопасность набора реагентов «НЕРА-В-тест-Q» в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования их хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации. При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с ограниченной ответственностью «ТестГен»
(ООО «ТестГен»),

432072, г. Ульяновск, 44-й Инженерный проезд, дом 9, офис 13
Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Инструкция по применению соответствует требованиям Приказа Минздрава России от 09.01.2014 №2н, Приказа Минздрава России от 19.01.2017 № 11н, ГОСТ 51088-2013.

Приложение А

Набор реагентов для количественного выявления ДНК вируса гепатита В методом ПЦР-РВ «HEPA-B-тест-Q» соответствует следующим межгосударственным стандартам на продукцию:

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2011	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Методы испытаний.
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р 56894-2016	Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем(маркировка). Часть 2.

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

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