АмплиПрайм

IVD

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита В (HBV) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® HBV»
по ТУ 21.20.23-160-09286667-2022

АмплиПрайм® HBV

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

НекстБИО
Биотехнологическая компания

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ 3
1. НАЗНАЧЕНИЕ 4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА 4
2.1. Формы выпуска, состав и комплектность 4
2.2. Принцип метода 6
2.3. Прослеживаемость значений калибраторов 7
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА 8
3.1. Внутренний контроль качества 8
3.2. Рекомендуемые контрольные материалы 9
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ 10
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ 10
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ 12
6.1. Взятие и предварительная обработка исследуемого материала 12
6.2. Экстракция ДНК из исследуемых образцов 12
6.3. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов 12
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ 13
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ 14
8.1 Экстракция ДНК из исследуемого материала 14
8.2 Подготовка реагентов для амплификации 17
8.3 Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции 18
8.4 Анализ и вычисление результатов 19
8.5 Интерпретация результатов 21
8.6 Возможные ошибки и рекомендации по их решению 22
8.7 Диагностическое значение полученного результата 23
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА 23
9.1. Предел обнаружения 23
9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения 23
9.3. Аналитическая специфичность 24
9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения 24
9.5. Правильность измерения 24
9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность 25
9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ 25
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА 27
10.1.Срок годности 27
10.2.Транспортирование 27
10.3.Хранение 27
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 28
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 29

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	– Cycle threshold (пороговый цикл)
HBV	– *Hepatitis B virus*
ВКО	– внутренний контрольный образец
ВОЗ	– всемирная организация здравоохранения
МЕ	– международные единицы
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
НК	– нуклеиновая кислота
ПК1	– положительный контрольный образец 1, калибратор ПКО-1 HBV или ПКО-1 HBV Lyo
ПК2	– положительный контрольный образец 2, калибратор ПКО-2 HBV или ПКО-2 HBV Lyo
К-	– отрицательный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец экстракции
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
ТУ	– технические условия
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита В (HBV) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® HBV» по ТУ 21.20.23-160-09286667-2022.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® HBV», а также сокращение Набор реагентов.

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® HBV» предназначен для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита В (HBV) в плазме крови методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

1.2. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных в разделе инструкции «Дополнительное оборудование и материалы».

1.3. Функциональное назначение: Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (выявление и количественное определение ДНК вируса гепатита В (HBV) методом ПЦР в плазме крови).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования плазмы крови, полученной от лиц с диагнозом вирусный гепатит В (после положительного серологического теста), для диагностики вирусного гепатита В, а также для скрининга и мониторинга эффективности лечения вирусного гепатита В. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

1.5. Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.6. Потенциальные пользователи: Набор реагентов должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

1.7. Применять набор реагентов строго по назначению согласно инструкции по применению.

1.8. Противопоказания к применению: Нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требований инструкции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Формы выпуска, состав и комплектность

Набор реагентов выпускается в четырех формах (состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно). Все формы предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

Форма выпуска 1 включает смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом 1,5 или 2 мл для дозирования в любые типы пробирок. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Форма может быть использована как для ручной раскапки, так и совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Форма выпуска 2 включает смесь для проведения ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по стрипованным (12,5 стрипов по 8 пробирок) пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

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

Форма выпуска 3 включает смесь для проведения ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Форма выпуска 4 включает лиофилизированную смесь для проведения ПЦР в стрипованных пробирках (12 стрипов по 8 пробирок) объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 96 образцов, включая контроли.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
ПЦР-смесь HBV	0,6	2 пробирки	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер С	0,3	2 пробирки	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.
Taq полимераза	0,06	2 пробирки	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО-1 HBV	0,025	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
ПКО-2 HBV	0,025	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
ВКО В	0,6	2 пробирки	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,1	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,3	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь HBV	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана в стрипованные пробирки под парафин белого цвета.
Буфер D	0,6	2 пробирки	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.
Taq полимераза	0,06	2 пробирки	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО-1 HBV	0,025	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
ПКО-2 HBV	0,025	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
ВКО В	0,6	2 пробирки	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,1	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,3	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 3			
ПЦР-смесь HBV	0,01	100 пробирок	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана под парафин.

[1] Пробирки с голубым парафином не используются.

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

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Буфер D	0,6	2 пробирки	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.
Taq полимераза	0,06	2 пробирки	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО-1 HBV	0,025	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
ПКО-2 HBV	0,025	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
ВКО В	0,6	2 пробирки	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,1	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,3	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 4			
ПЦР-смесь HBV Lyo	-	96 пробирок (12 стрипов по 8 пробирок)	Лиофилизированная ПЦР-смесь, содержащая специфические праймеры, флуоресцентно-меченые зонды, дНТФ, ионы двухвалентного магния, урацил-ДНК-гликозилазу, термостабильную ДНК-полимеразу Taq, декстран, трегалозу. Лиофилизат белого цвета.
ПКО-1 HBV Lyo	-	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Лиофилизат белого цвета.
ПКО-2 HBV Lyo	-	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Лиофилизат белого цвета.
ВКО В Lyo	-	2 пробирки	Внутренний контрольный образец. Лиофилизат белого цвета.
ОКО	1,1	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Разбавитель	1,2	2 пробирки	Раствор для восстановления ПКО-1 HBV Lyo, ПКО-2 HBV Lyo, ВКО В Lyo. Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1, 2, 3 или 4)	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде[2] на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО В) и одновременной амплификации участка ДНК вируса гепатита В и искусственно синтезированной последовательности ДНК ВКО с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». ВКО позволяет контролировать все этапы

[2] Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

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

ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Количественное определение ДНК вируса гепатита В основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). При проведении количественного теста амплификация ДНК исследуемых образцов проводится одновременно с калибраторами ПКО-1 HBV (или ПКО-1 HBV Lyo) и ПКО-2 HBV (или ПКО-2 HBV Lyo) – образцами с известной концентрацией ДНК HBV. По результатам проводится расчет концентрации относительно каждого калибратора, с учетом потерь, которые отслеживаются по смещению Ct для ВКО. Концентрация калибраторов измерена относительно Международного стандарта ВОЗ для количественного определения вируса гепатита В, и количество вируса определяется в международных единицах на мл (МЕ/мл).

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке амплифицируются участок ДНК вируса гепатита В (HBV) и последовательность ВКО. Результаты амплификации регистрируются по двум различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G[3]
ДНК-мишень	ВКО (экзогенный ВКО)	ДНК HBV
Область амплификации	Искусственно синтезированная последовательность	X ген

2.3. Прослеживаемость значений калибраторов

Измерение значений концентрации калибраторов ПКО-1 HBV (или ПКО-1 HBV Lyo) и ПКО-2 HBV (или ПКО-2 HBV Lyo) производится относительно рабочих калибраторов производства ООО «НекстБио». Концентрацию рабочих калибраторов определяют стандартизированной методикой прямого

[3] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

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

измерения концентрации контрольных образцов на основе генно-модифицированных конструкций с использованием спектрофотометра. Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибраторов составляет не более 5% (с уровнем доверительной вероятности 95%).

Концентрация рабочих положительных контролей измерена относительно четвертого международного стандарта ВОЗ для ДНК HBV (NIBSC code 10/266) и выражена в МЕ/мл. Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибраторов составляет не более 5% (с уровнем доверительной вероятности 95%). Концентрация новых серий положительных контролей производится относительно рабочих контролей (каждая серия) и относительно стандарта ВОЗ (одна из 10-ти серий).

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1. Внутренний контроль качества

3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО – искусственной ДНК-содержащей конструкции, которая вносится в каждый исследуемый образец биоматериала, отрицательный контрольный образец этапа экстракции и положительные контрольные образцы. Результаты исследования образцов должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если результаты тестирования исследуемых образцов, полученные для ВКО, не соответствуют заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов», то результаты исследования данных образцов считаются невалидными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК HBV. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК HBV и отрицательного контроля, начиная с этапа экстракции.

Отрицательный контроль ПЦР (К-) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем ПЦР не должна детектироваться ДНК HBV или ВКО. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК HBV или ВКО, начиная с этапа ПЦР.

В качестве положительного контроля используются реагенты ПКО-1 HBV (или ПКО-1 HBV Lyo) и ПКО-2 HBV (или ПКО-2 HBV Lyo), входящие в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

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

3.1.2. Анализ калибровки

Количественная оценка концентрации ДНК HBV в исследуемых образцах проводится относительно количественно охарактеризованных калибровочных образцов ПКО-1 HBV (или ПКО-1 HBV Lyo) и ПКО-2 HBV (или ПКО-2 HBV Lyo). Положительные контрольные образцы представляют собой модифицированный бактериофаг λ с известной концентрацией ДНК HBV. Исследование калибровочных образцов проводится параллельно с исследованием образцов, начиная с этапа экстракции.

Определение концентрации ДНК проводится в соответствии с заданными значениями концентраций калибровочных образцов и полученными значениями порогового цикла (Ct) для калибровочных образцов и исследуемых образцов. Эффективность калибровки должна укладываться в заданный диапазон. Если результаты, полученные для положительных контрольных образцов, не соответствуют заданным, необходимо повторить исследование, начиная с этапа экстракции.

3.1.3. Контроль ингибирования

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО (реагент ВКО В), который добавляется в каждый исследуемый и контрольные образцы на этапе экстракции. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности для положительных и отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах не обнаружена ДНК ВКО, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции.

3.1.4. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09. Также для предотвращения контаминации лаборатории или в качестве мер по деконтаминации рабочих зон рекомендуется использовать раствор для дезактивации нуклеиновых кислот, например, «Олигатор» производства ООО «НекстБио», Россия.

3.2. Рекомендуемые контрольные материалы

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по обнаружению ДНК HBV.

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

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – ВКО В. Без использования ВКО В невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. Набор предназначен для профессионального применения. Набор должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

4.6. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением требований СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и 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 п. 4.4. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» допускается проведение исследований биологического материала (без предварительного накопления возбудителя) на наличие ДНК (РНК) возбудителей парентеральных вирусных гепатитов в лаборатории, имеющей санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями III-IV группы патогенности. Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.2569-09.

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

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

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

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

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

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку[4], биологический материал[5], включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Набор предназначен для однократного применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества образцов (см. раздел «Формы выпуска, состав и комплектность»).

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21).

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

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

- Не смешивать реагенты разных серий.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

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

- При контакте немедленно промыть пораженное место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора (кроме Taq полимеразы и Разбавителя) содержат натрия азид в концентрации не более 0,1 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности, кроме указанных в данном разделе.

[4] Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

[5] Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

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

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие и предварительная обработка исследуемого материала

Взятие и предварительную обработку исследуемого материала проводить согласно МУ 1.3.2569-09.

6.2. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.2.1. Набор реагентов для экстракции нуклеиновых кислот, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (плазма крови) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;
- набор не относится к экспресс-методам экстракции ДНК;
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 50 мкл.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли «МагноПрайм® Ультра» и «АмплиПрайм РИБО-преп» (РУ № ФСР 2012/14017).

6.2.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

6.3. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.3.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов (при использовании формы выпуска 1):

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора роторного типа.

6.3.2. Завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 - 2 мл – для приготовления реакционной смеси.

6.3.3. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл.

6.3.4. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.3.5. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.3.6. Центрифуга-вортекс.

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

6.3.7. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.3.8. Станция автоматическая с модулем для приготовления и раскапки реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - при использовании формы выпуска 1 в случае приготовления реакционной смеси с использованием автоматической станции.

6.3.9. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного типа, либо планшетного типа, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM и R6G со следующими характеристиками:

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100 °С;
- точность поддержания температуры ≤ ±0,4 °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»: Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), Applied Biosystems QuantStudio 5 (РУ № РЗН 2019/8446), C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399), ДТпрайм (РУ № ФСР 2011/10229).

6.3.10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

6.3.11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.3.12. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служит плазма крови.

Взятие, предварительную обработку, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

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

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории[6]:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75 %.

8.1 Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

8.1.1 При использовании форм выпуска 1, 2, 3.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОКО) и положительных контрольных образцов (ПКО-1 HBV и ПКО-2 HBV) в указанном числе повторов:

- ОКО – в одном повторе;
- ПКО-1 HBV – в двух повторах при первой постановке используемой серии набора, в одном – при последующих (только при постановке в количественном формате);
- ПКО-2 HBV – в двух повторах при первой постановке в количественном формате, в одном – при последующих постановках в количественном формате и при постановке в качественном формате.

ВНИМАНИЕ! Калибратор **ПКО-1 HBV** используется только при проведении количественного анализа.

Перед экстракцией необходимо разморозить контрольные образцы: ВКО В, ОКО, ПКО-1 HBV и ПКО-2 HBV.

ВНИМАНИЕ! Размораживать следует только необходимое количество пробирок с реагентами. Для одной постановки ПЦР требуется разморозка не более одной пробирки с ПКО-1 HBV и ПКО-2 HBV.

В процессе экстракции ДНК использовать объемы реагентов и исследуемых образцов согласно таблице 5.

ВНИМАНИЕ! Реагент ВКО В вносится в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами (включая положительные и отрицательный контроли).

ВНИМАНИЕ! Для экстракции ДНК из 100 мкл исследуемого образца используется комплект «АмплиПрайм РИБО-преп», из 200 мкл – «МагноПрайм® Ультра», форма выпуска 1, из 1000 мкл – «МагноПрайм® Ультра» форма выпуска 2 или другие рекомендуемые наборы (см. п. 6.2).

[6] Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

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

Таблица 5

Объемы реагентов и исследуемых образцов при использовании форм выпуска 1, 2, 3

Реагент / образец	Объем	Добавлять
При экстракции из 100 мкл образца		
Исследуемый образец	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО
ПКО-1 HBV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК1
ПКО-2 HBV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК2
Реагент, используемый для элюции ДНК	50[7] мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 200 мкл образца		
Исследуемый образец	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОКО
ПКО-1 HBV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК1
ПКО-2 HBV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК2
Реагент, используемый для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 1000 мкл образца		
Исследуемый образец	1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	1000 мкл	в пробирку для ОКО
ПКО-1 HBV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК1
ПКО-2 HBV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК2
Реагент, используемый для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку

8.1.2 При использовании формы выпуска 4.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОКО) и положительных контрольных образцов (ПКО-1 HBV Lyo и ПКО-2 HBV Lyo) в указанном числе повторов:

- ОКО – в одном повторе;
- ПКО-1 HBV Lyo – в двух повторах при первой постановке используемой серии набора, в одном – при последующих (только при постановке в количественном формате);
- ПКО-2 HBV Lyo – в двух повторах при первой постановке в количественном формате, в одном – при последующих постановках в количественном формате и при постановке в качественном формате.

ВНИМАНИЕ! Калибратор **ПКО-1 HBV Lyo** используется только при проведении количественного анализа.

ВНИМАНИЕ! Реагенты ПКО-1 HBV Lyo, ПКО-2 HBV Lyo и ВКО В Lyo требуют восстановления.

Для восстановления лиофилизированных реагентов необходимо в пробирку с лиофилизатом добавить **Разбавитель** в объеме, указанном в таблице 6, перемешать содержимое пробирок с восстановленными реагентами, осадить капли на вортексе.

[7] При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.

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

Таблица 6

Объем Разбавителя для восстановления реагентов

Реагент	Разбавитель, мкл
ПКО-1 HBV Lyo	25
ПКО-2 HBV Lyo	25
ВКО B Lyo	600

В процессе экстракции ДНК использовать объемы реагентов и исследуемых образцов согласно таблице 7.

ВНИМАНИЕ! Реагент ВКО B Lyo вносится в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами (включая положительные и отрицательный контроли).

ВНИМАНИЕ! Для экстракции ДНК из 100 мкл исследуемого образца используется комплект «АмплиПрайм РИБО-преп», из 200 мкл – «МагноПрайм® Ультра», форма выпуска 1, из 1000 мкл – «МагноПрайм® Ультра» форма выпуска 2 или другие рекомендуемые наборы (см. п. 6.2).

Таблица 7

Объемы реагентов и исследуемых образцов при использовании формы выпуска 4

Реагент / образец	Объем	Добавлять
При экстракции из 100 мкл образца		
Исследуемый образец	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО B Lyo (восстановленный)	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО
ПКО-1 HBV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК1
ПКО-2 HBV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК2
Реагент, используемый для элюции ДНК	50[8] мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 200 мкл образца		
Исследуемый образец	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО B Lyo (восстановленный)	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОКО
ПКО-1 HBV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК1
ПКО-2 HBV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК2
Реагент, используемый для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 1000 мкл образца		
Исследуемый образец	1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО B Lyo (восстановленный)	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	1000 мкл	в пробирку для ОКО
ПКО-1 HBV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК1
ПКО-2 HBV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК2
Реагент, используемый для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку

[8] При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.

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

8.2 Подготовка реагентов для амплификации

8.2.1 При использовании формы выпуска 1.

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

ВНИМАНИЕ! Необходимо минимизировать время нахождения Taq полимеразы при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.1.1 Рассчитать объемы реагентов, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 8). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 8

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь HBV	**10***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Буфер С	**5***(N+1)	
Taq полимераза	**1***(N+1)	

8.2.1.2 Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами, осадить капли на вортексе.

8.2.1.3 Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.1.4 Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.1.5 Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной **реакционной смеси**.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.2.2 При использовании формы выпуска 2 и 3.

ВНИМАНИЕ! Необходимо минимизировать время нахождения Taq полимеразы при комнатной температуре.

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

8.2.2.1 Рассчитать объемы **Буфера D** и **Taq полимеразы**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 9). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 9

Расчет объемов компонентов реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
Буфер D	**10***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Taq полимераза	**1***(N+1)	

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

8.2.2.2 Разморозить Буфер D. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами, осадить капли на вортексе.

8.2.2.3 Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.2.4 Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов с **ПЦР-смесью HBV** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

8.2.2.5 Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

8.2.2.6 На поверхность парафина внести по **10 мкл приготовленной реакционной смеси**, при этом она не должна проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.2.3 При использовании формы выпуска 4.

Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью HBV Lyo** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

8.3 Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе (качественный формат) программирование и запуск амплификатора проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору. При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

8.3.1 Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью/лиофилизатом пробы ДНК, полученные в результате экстракции из тестируемых и контрольных образцов, и отрицательный контроль ПЦР – реагент **К-** или **Разбавитель** в соответствии с таблицей 10.

Таблица 10

Образцы и их объемы для проведения амплификации

Объем тестируемого образца, мкл	Контрольный образец	Объем контрольного образца, мкл
При использовании форм выпуска 1, 2, 3		
10	ПКО-1 HBV (только при количественном анализе)	10
	ПКО-2 HBV (при качественном или количественном анализе)	
	ОКО	
	К-	
При использовании формы выпуска 4		
20	ПКО-1 HBV Lyo (только при количественном анализе)	20
	ПКО-2 HBV Lyo (при качественном или количественном анализе)	
	ОКО	
	Разбавитель	

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

8.3.2 Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 11).

Таблица 11

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[9]	

Примечание - С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

8.3.3 Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.4 Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

8.3.5 Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.6 Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.4 Анализ и вычисление результатов

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! Количественный анализ результатов возможно проводить только в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора (см. вкладыш к набору и инструкцию по применению амплификатора).

[9] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

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

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по двум каналам детекции (см. таблицу 12).

Таблица 12

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G
Продукт амплификации	ВКО	ДНК HBV

На основании полученных значений порогового цикла (Ct) и заданных значений концентраций для калибраторов строится калибровочная кривая, по которой проводится автоматический расчет концентрации международных единиц ДНК HBV в 1 мл биологического образца (МЕ/мл).

При количественном анализе расчет концентрации ДНК HBV выполняется в двух вариантах:

- в МЕ ДНК возбудителя на 1 мл образца;
- в логарифмах МЕ ДНК возбудителя на 1 мл образца.

Расчет концентрации ДНК HBV проводится по формуле:

$$\mathbf{C_{обр} = Коэффициент\ A \times ((C_{обр\text{-}1} + C_{обр\text{-}2}) / 2),}$$

$$\mathbf{Коэффициент\ A = 100 / объем\ экстракции\ (мкл),}$$

$$\mathbf{C_{обр\text{-}1} = C_{пк1}/2\text{^} ((Ct_{обр.\ спец} - Ct_{пк1\ спец}) - (Ct_{обр.\ вко} - Ct_{пк1\ вко})),}$$

$$\mathbf{C_{обр\text{-}2} = C_{пк2}/2\text{^} ((Ct_{обр.\ спец} - Ct_{пк2\ спец}) - (Ct_{обр.\ вко} - Ct_{пк2\ вко})),}$$

где:

$\mathbf{C_{обр}}$ – расчетное значение концентрации ДНК HBV (МЕ/мл) для каждого тестируемого образца;

$\mathbf{C_{обр\text{-}1}}$ – расчетное значение концентрации ДНК HBV (МЕ/мл) для каждого тестируемого образца, рассчитанное с учетом значений, полученных для ПК1;

$\mathbf{C_{обр\text{-}2}}$ – расчетное значение концентрации ДНК HBV (МЕ/мл) для каждого тестируемого образца, рассчитанное с учетом значений, полученных для ПК2;

$\mathbf{C_{пк1}}$ – концентрация ПК1 (МЕ/мл), указана во вкладыше к набору реагентов для калибратора ПКО-1 HBV / ПКО-1 HBV Lyo;

$\mathbf{C_{пк2}}$ – концентрация ПК2 (МЕ/мл)), указана во вкладыше к набору реагентов для калибратора ПКО-2 HBV / ПКО-2 HBV Lyo;

$\mathbf{Ct_{обр.\ спец}}$ – значение Ct для тестируемого образца по каналу R6G;

$\mathbf{Ct_{пк1\ спец}}$[10] – значение Ct для образца ПК1 по каналу R6G;

$\mathbf{Ct_{пк2\ спец}}$[10] – значение Ct для образца ПК2 по каналу R6G;

$\mathbf{Ct_{обр.\ вко}}$ – значение Ct для тестируемого образца по каналу FAM;

$\mathbf{Ct_{пк1\ вко}}$[10] – значение Ct для образца ПК1 по каналу FAM;

$\mathbf{Ct_{пк2\ вко}}$[10] – значение Ct для образца ПК2 по каналу FAM.

Для получения результатов в Lg X МЕ/мл необходимо воспользоваться функцией LOG в программе Microsoft Excel.

[10] При первой постановке серии набора для расчета используется среднее значение Ct, полученное для двух повторов калибраторов.

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

8.5 Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- в качественном формате вручную в соответствии с таблицей 13 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 15;

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 14 и 15 соответственно.

Таблица 13

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении качественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM** и **R6G не определено или определено выше граничного**[11]	**Невалидный!** Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного**, а по каналу для флуорофора **R6G выше граничного**	**Результат сомнительный**
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного**, а по каналу для флуорофора **R6G не определено**	**ДНК HBV не обнаружена**
Значение Ct по каналу для флуорофора **R6G определено не выше граничного.** При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.	**ДНК HBV обнаружена**

Таблица 14

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM** и **R6G не определено или определено выше граничного**[11]	**Невалидный!** Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM не определено или определено выше граничного,** а по каналу для флуорофора **R6G определено не выше граничного**	**Обнаружена ДНК HBV. Количественный расчет невозможен**
Рассчитанное значение концентрации ДНК по каналу для флуорофора **R6G меньше нижнего предела линейного диапазона измерения** набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного**	**ДНК HBV обнаружена в концентрации менее 250 МЕ/мл** при экстракции из 100 мкл образца
	ДНК HBV обнаружена в концентрации менее 125 МЕ/мл при экстракции из 200 мкл образца

[11] Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

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

Результат	Интерпретация
	ДНК HBV обнаружена в концентрации менее 25 МЕ/мл при экстракции из 1000 мкл образца
Рассчитанное значение концентрации ДНК по каналу для флуорофора **R6G** находится **в пределах линейного диапазона измерения** набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного**	**ДНК HBV обнаружена в концентрации Xx10^{y} МЕ/мл или Lg X МЕ/мл**
Рассчитанное значение концентрации ДНК по каналу для флуорофора **R6G выше верхнего предела линейного диапазона измерения** набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного**	**ДНК HBV обнаружена в концентрации более 1x10^{8} МЕ/мл**
Значение Ct по каналу для флуорофора **R6G не определено**, а по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного**	**ДНК HBV не обнаружена**

Таблица 15

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора	
	FAM	**R6G**
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Определено значение Ct не выше граничного[12]	Значение Ct отсутствует
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует	
ПК2	Определено значение Ct не выше граничного	
ПК1 ПК2	-	Показатель эффективности амплификации (E) для калибраторов укладывается в диапазон 0,8 – 1,2[13]; Коэффициент детерминации (R^2) не менее 0,99[13, 14]

8.6 Возможные ошибки и рекомендации по их решению

8.6.1 Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналу для флуорофора R6G определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК выявляемого вируса, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.2 Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу для флуорофора FAM и/или R6G/HEX/JOE/VIC определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК выявляемого вируса, начиная с этапа амплификации ДНК.

[12] Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.
[13] Данные критерии учитываются только при постановке в количественном формате.
[14] Коэффициент детерминации (R^2) учитывается при первой постановке используемой серии набора.

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

8.6.3 Если показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %, необходимо проверить правильность заданных значений концентраций калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить исследование, начиная с этапа ПЦР.

8.6.4 Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.6.5 В случае получения невалидных или сомнительных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести взятие, предварительную подготовку и исследование образца.

8.7 Диагностическое значение полученного результата

ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента. Результаты, полученные при использовании набора, следует рассматривать и интерпретировать в сочетании с данными других клинических и лабораторных исследований.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения[15]

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® HBV» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 16).

Значения характеристики, указанные в таблице 16, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 16

Предел обнаружения набора

Объем биоматериала при экстракции, мкл	Предел обнаружения по Probit 95%, МЕ/мл	95%-ый доверительный интервал, МЕ/мл
100	50	42,8 – 58,6
200	25	22,5 – 28,2
1000	5	4,8 – 5,3

9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Диапазон, в котором набор дает линейный ответ, приведен в таблице 17. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора. Указанные значения характеристики достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

[15] Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК выявляемого возбудителя, при которой 95% тестов дают положительный результат).

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

Таблица 17

Линейный диапазон измерения набора

Объем биоматериала при экстракции, мкл	Линейный диапазон измерения, МЕ/мл
100	$2,5x10^2 – 1x10^8$
200	$1,25x10^2 – 1x10^8$
1000	$2,5x10^1 – 1x10^8$

9.3. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает только фрагмент ДНК вируса гепатита В (HBV).

Аналитическая специфичность набора «АмплиПрайм® HBV» оценивалась тестированием НК микроорганизмов и вирусов (см. таблицу 18) и геномной ДНК человека. НК микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее $1x10^6$ копий/мл и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие ДНК HBV.

Таблица 18

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
Hepatitis C virus (HCV)	*Herpes simplex virus* I (HSV I)
Human immunodeficiency virus type1 (HIV-1)	*Herpes simplex virus* II (HSV II)
Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2)	*Staphylococcus aureus*
Epstein-Barr virus (EBV)	*Streptococcus pyogenes*
Cytomegalovirus (CMV)	*Streptococcus agalactiae*
Human herpesvirus 6 (HHV6)	*Pseudomonas aeruginosa*
Varicella Zoster virus (VZV)	*Escherichia coli*

При тестировании образцов НК вышеперечисленных микроорганизмов и вирусов и геномной ДНК человека с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость результатов с использованием набора оценивали путем тестирования модельных образцов. Модельные образцы были приготовлены путем контаминации образцов плазмы крови стандартным образцом предприятия, содержащим искусственно-синтезированную ДНК HBV. Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

При оценке повторяемости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения концентрации ДНК HBV, не превышал 5 %.

При оценке воспроизводимости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения концентрации ДНК HBV, не превышал 10 %.

9.5. Правильность измерения

Правильность измерения с использованием набора «АмплиПрайм® HBV» была определена путем тестирования стандартного образца предприятия, содержащего искусственно-синтезированную ДНК HBV, в 160 повторах (см. таблицу 19).

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

Таблица 19

Правильность измерения

Среднее значение концентрации ДНК HBV, log_{10}	Установленное значение концентрации, log_{10}	Систематическая погрешность (B)	
		log_{10}	%
5,67	5,7	0,03	0,5

9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® HBV» были использованы 828 образцов плазмы крови.

В качестве наборов сравнения, с помощью которых устанавливали наличие/отсутствие ДНК HBV использовались наборы реагентов «АмплиСенс® HCV/HBV/HIV-FL» (РУ № ФСР 2009/06187) и «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL» (РУ № ФСР 2007/00584).

Результаты тестирования набора «АмплиПрайм® HBV» в сравнении с наборами сравнения приведены в таблице 20.

Таблица 20

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® HBV»

Исследуемые образцы		Результаты тестирования			
Тип	Количество	Образцы	Тестируемый набор	Наборы сравнения	
			АмплиПрайм® HBV	АмплиСенс® HCV/HBV/HIV-FL	АмплиСенс® HBV-Монитор-FL
Плазма крови	828	Положительных	184	184	184
		Отрицательных	644	644	Тестирование не проводилось

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® HBV» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 21.

Таблица 21

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® HBV»

Тип образцов	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность
Плазма крови	100 % (99,43 % – 100 %)	100 % (98,02 % – 100 %)

9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® HBV» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 22, в максимально возможной концентрации.

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

Таблица 22

Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора «АмплиПрайм® HBV»

Интерферент	Концентрация интерферента в образце
гемоглобин	200 мг/мл
иммуноглобулин G	16 мг/мл
лактоферрин	1 мкг/мл
билирубин	200 мг/мл
триглицериды	5000-30000 мг/мл
альбумин	50000 - 60000 мг/мл
ДНК человека	1×10^8 копий/мл

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности всех форм выпуска набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать согласно срокам, указанным в п.10.3. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

10.2.1. Формы выпуска 1, 2, 3

Набор транспортировать при температуре от минус 24 до минус 16 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.2.2. Форма выпуска 4

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 3 суток.

Не допускается замораживание реагентов набора.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

10.3.1. Формы выпуска 1, 2, 3

Набор хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.

Контрольные образцы (ПКО-1 HBV, ПКО-2 HBV, ВКО В и ОКО) после разморозки хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 6 месяцев. Не допускается повторная заморозка контрольных образцов. Остальные реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Необходимо минимизировать время нахождения Taq полимеразы при комнатной температуре.

Реакционная смесь, приготовленная из реагентов, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

10.3.2. Форма выпуска 4

Набор беречь от влаги. Хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора. ПЦР-смесь HBV Lyo хранить в пакете с силикагелем.

Восстановленные контрольные образцы (ПКО-1 HBV Lyo, ПКО-2 HBV Lyo, ВКО В Lyo) хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев.

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

Упаковку с лиофилизированными реагентами (ПКО-1 HBV Lyo, ПКО-2 HBV Lyo, ВКО В Lyo) необходимо вскрывать непосредственно перед их восстановлением.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты (за исключением восстановленных) стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Не допускается замораживание реагентов набора.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® HBV» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

При выявлении нежелательных реакций при использовании набора, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в Российской Федерации – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

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

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Не допускать попадания солнечного света
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		Беречь от влаги

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

АмплиПрайм

НекстБИО
Биотехнологическая компания

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита В (HBV) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® HBV» по ТУ 21.20.23-160-09286667-2022

АмплиПрайм® HBV

Форма выпуска 1

REF 2121-21

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ плазма крови

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

IVD

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь HBV	Прозрачная жидкость	0,6	2 пробирки
Буфер С	Прозрачная жидкость	0,3	2 пробирки
Taq полимераза	Прозрачная жидкость	0,06	2 пробирки
ПКО-1 HBV	Прозрачная жидкость	0,025	4 пробирки
ПКО-2 HBV	Прозрачная жидкость	0,025	4 пробирки
ВКО В	Прозрачная жидкость	0,6	2 пробирки
ОКО	Прозрачная жидкость	1,1	2 пробирки
К-	Прозрачная жидкость	0,3	2 пробирки
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 1
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
Набор хранить при температуре от – 24 до – 16 °С в защищенном от света месте. Необходимо минимизировать время нахождения Taq полимеразы при комнатной температуре. Контрольные образцы (ПКО-1 HBV, ПКО-2 HBV, ВКО В и ОКО) после разморозки хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 6 месяцев. Не допускается повторная заморозка контрольных образцов.

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® HBV». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! Для экстракции из 100 мкл исследуемого образца используется комплект «АмплиПрайм РИБО-преп», из 200 или 1000 мкл – «МагноПрайм® Ультра» или другие наборы, рекомендуемые в инструкции по применению набора.

ВНИМАНИЕ! Калибратор **ПКО-1 HBV** используется только при проведении количественного анализа: в двух повторах при первой постановке используемой серии набора, в одном – при последующих. Калибратор **ПКО-2 HBV** используется в двух повторах при первой постановке в количественном формате, в одном – при последующих постановках в количественном формате и при постановке в качественном формате.

ВНИМАНИЕ! Реагент ВКО В вносится в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами (включая положительные (ПКО-1 HBV, ПКО-2 HBV) и отрицательный (ОКО) контроли).

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
При экстракции из 100 мкл образца		
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HBV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HBV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции ДНК	50[1] мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 200 мкл образца		
Исследуемые образцы	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HBV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HBV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 1000 мкл образца		
Исследуемые образцы	1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	1000 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HBV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HBV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку

[1] При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Рассчитать объемы реагентов, необходимые для приготовления реакционной смеси, согласно таблице:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь HBV	**10***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Буфер С	**5***(N+1)	
Taq полимераза	**1***(N+1)	

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

ВНИМАНИЕ! Необходимо минимизировать время нахождения Taq полимеразы при комнатной температуре.

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами, осадить капли на вортексе.

3. Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

5. Внести в подготовленные пробирки реакционную смесь и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в пробирки для исследуемых и контрольных образцов
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К–	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ПЦР)
Пробы, экстрагированной из ПКО-1 HBV *(только при количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК1 (положительного контроля)
Пробы, экстрагированной из ПКО-2 HBV *(при качественном или количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК2 (положительного контроля)

6. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[2]	

[2] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

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

Примечания

1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

7. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
8. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.
9. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;
- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

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

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита В (HBV) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® HBV» по ТУ 21.20.23-160-09286667-2022

АмплиПрайм® HBV

Форма выпуска 2

REF P2121-22

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

IVD

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ плазма крови

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь HBV	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]
Буфер D	Прозрачная жидкость	0,6	2 пробирки
Taq полимераза	Прозрачная жидкость	0,06	2 пробирки
ПКО-1 HBV	Прозрачная жидкость	0,025	4 пробирки
ПКО-2 HBV	Прозрачная жидкость	0,025	4 пробирки
ВКО В	Прозрачная жидкость	0,6	2 пробирки
ОКО	Прозрачная жидкость	1,1	2 пробирки
К-	Прозрачная жидкость	0,3	2 пробирки
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 2
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
Набор хранить при температуре от – 24 до – 16 °С в защищенном от света месте. Необходимо минимизировать время нахождения Taq полимеразы при комнатной температуре. Контрольные образцы (ПКО-1 HBV, ПКО-2 HBV, ВКО В и ОКО) после разморозки хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 6 месяцев. Не допускается повторная заморозка контрольных образцов.

[1] Пробирки с голубым парафином не используются.

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® HBV». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! Для экстракции из 100 мкл исследуемого образца используется комплект «АмплиПрайм РИБО-преп», из 200 или 1000 мкл – «МагноПрайм® Ультра» или другие наборы, рекомендуемые в инструкции по применению набора.

ВНИМАНИЕ! Калибратор **ПКО-1 HBV** используется только при проведении количественного анализа: в двух повторах при первой постановке используемой серии набора, в одном – при последующих. Калибратор **ПКО-2 HBV** используется в двух повторах при первой постановке в количественном формате, в одном – при последующих постановках в количественном формате и при постановке в качественном формате.

ВНИМАНИЕ! Реагент ВКО В вносится в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами (включая положительные (ПКО-1 HBV, ПКО-2 HBV) и отрицательный (ОКО) контроли).

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
При экстракции из 100 мкл образца		
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HBV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HBV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции ДНК	50[2] мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 200 мкл образца		
Исследуемые образцы	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HBV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HBV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 1000 мкл образца		
Исследуемые образцы	1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	1000 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HBV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HBV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку

[2] При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Рассчитать объемы реагентов, необходимые для приготовления реакционной смеси, согласно таблице:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
Буфер D	**10***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Taq полимераза	**1***(N+1)	

ВНИМАНИЕ! Необходимо минимизировать время нахождения Taq полимеразы при комнатной температуре.

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

2. Разморозить Буфер D. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами, осадить капли на вортексе.

3. Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью HBV** для проведения амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

5. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

6. Внести в подготовленные пробирки реакционную смесь и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 10 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в пробирки с ПЦР-смесью HBV на поверхность парафина **ВНИМАНИЕ!** Реакционная смесь не должна проваливаться под парафин.
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К–	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ПЦР)
Пробы, экстрагированной из ПКО-1 HBV *(только при количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК1 (положительного контроля)
Пробы, экстрагированной из ПКО-2 HBV *(при качественном или количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК2 (положительного контроля)

7. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[3]	

[3] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

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

Примечания

1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

8. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

9. Установить стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

10. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;
- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

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

АмплиПрайм

НекстБИО
Биотехнологическая компания

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита В (HBV) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® HBV» по ТУ 21.20.23-160-09286667-2022

АмплиПрайм® HBV

Форма выпуска 3

REF P2121-23

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

IVD

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ плазма крови

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь HBV	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин	0,01	100 пробирок
Буфер D	Прозрачная жидкость	0,6	2 пробирки
Taq полимераза	Прозрачная жидкость	0,06	2 пробирки
ПКО-1 HBV	Прозрачная жидкость	0,025	4 пробирки
ПКО-2 HBV	Прозрачная жидкость	0,025	4 пробирки
ВКО В	Прозрачная жидкость	0,6	2 пробирки
ОКО	Прозрачная жидкость	1,1	2 пробирки
К-	Прозрачная жидкость	0,3	2 пробирки
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 3
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
Набор хранить при температуре от – 24 до – 16 °С в защищенном от света месте. Необходимо минимизировать время нахождения Taq полимеразы при комнатной температуре. Контрольные образцы (ПКО-1 HBV, ПКО-2 HBV, ВКО В и ОКО) после разморозки хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 6 месяцев. Не допускается повторная заморозка контрольных образцов.

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® HBV». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! Для экстракции из 100 мкл исследуемого образца используется комплект «АмплиПрайм РИБО-преп», из 200 или 1000 мкл – «МагноПрайм® Ультра» или другие наборы, рекомендуемые в инструкции по применению набора.

ВНИМАНИЕ! Калибратор **ПКО-1 HBV** используется только при проведении количественного анализа: в двух повторах при первой постановке используемой серии набора, в одном – при последующих. Калибратор **ПКО-2 HBV** используется в двух повторах при первой постановке в количественном формате, в одном – при последующих постановках в количественном формате и при постановке в качественном формате.

ВНИМАНИЕ! Реагент ВКО В вносится в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами (включая положительные (ПКО-1 HBV, ПКО-2 HBV) и отрицательный (ОКО) контроли).

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
При экстракции из 100 мкл образца		
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HBV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HBV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции ДНК	50[1] мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 200 мкл образца		
Исследуемые образцы	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HBV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HBV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 1000 мкл образца		
Исследуемые образцы	1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	1000 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HBV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HBV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку

[1] При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Рассчитать объемы реагентов, необходимые для приготовления реакционной смеси, согласно таблице:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
Буфер D	**10***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Taq полимераза	**1***(N+1)	

ВНИМАНИЕ! Необходимо минимизировать время нахождения Taq полимеразы при комнатной температуре.

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

2. Разморозить Буфер D. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами, осадить капли на вортексе.

3. Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью HBV** для проведения амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

5. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

6. Внести в подготовленные пробирки реакционную смесь и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 10 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в пробирки с ПЦР-смесью HBV на поверхность парафина **ВНИМАНИЕ!** Реакционная смесь не должна проваливаться под парафин.
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К–	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ПЦР)
Пробы, экстрагированной из ПКО-1 HBV *(только при количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК1 (положительного контроля)
Пробы, экстрагированной из ПКО-2 HBV *(при качественном или количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК2 (положительного контроля)

7. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[2]	

[2] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

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

Примечания

1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

8. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

9. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

10. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;
- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

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

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита В (HBV) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® HBV» по ТУ 21.20.23-160-09286667-2022

АмплиПрайм® HBV

Форма выпуска 4

REF 2121-24

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

IVD

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ плазма крови

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь HBV Lyo	Лиофилизат белого цвета	-	96 пробирок (12 стрипов по 8 пробирок)
ПКО-1 HBV Lyo	Лиофилизат белого цвета	-	4 пробирки
ПКО-2 HBV Lyo	Лиофилизат белого цвета	-	4 пробирки
ВКО В Lyo	Лиофилизат белого цвета	-	2 пробирки
ОКО	Прозрачная жидкость	1,1	2 пробирки
Разбавитель	Прозрачная жидкость	1,2	2 пробирки
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 4
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
Набор беречь от влаги. Хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте. Восстановленные контрольные образцы (ПКО-1 HBV Lyo, ПКО-2 HBV Lyo, ВКО В Lyo) хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев. ПЦР-смесь HBV Lyo хранить в пакете с силикагелем. Упаковку с лиофилизированными реагентами необходимо вскрывать непосредственно перед их восстановлением. Не допускается замораживание реагентов набора.

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® HBV». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! Для экстракции из 100 мкл исследуемого образца используется комплект «АмплиПрайм РИБО-преп», из 200 или 1000 мкл – «МагноПрайм® Ультра» или другие наборы, рекомендуемые в инструкции по применению набора.

ВНИМАНИЕ! Калибратор **ПКО-1 HBV Lyo** используется только при проведении количественного анализа: в двух повторах при первой постановке используемой серии набора, в одном – при последующих. Калибратор **ПКО-2 HBV Lyo** используется в двух повторах при первой постановке в количественном формате, в одном – при последующих постановках в количественном формате и при постановке в качественном формате.

ВНИМАНИЕ! Реагент ВКО B Lyo вносится в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами (включая положительные (ПКО-1 HBV Lyo, ПКО-2 HBV Lyo) и отрицательный (ОКО) контроли).

ВНИМАНИЕ! Реагенты ПКО-1 HBV Lyo, ПКО-2 HBV Lyo и ВКО B Lyo требуют восстановления.

Для восстановления лиофилизированных реагентов необходимо в пробирку с лиофилизатом добавить Разбавитель в объеме, указанном в таблице ниже.

Реагент	Разбавитель, мкл
ПКО-1 HBV Lyo	25
ПКО-2 HBV Lyo	25
ВКО B Lyo	600

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
При экстракции из 100 мкл образца		
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО B Lyo (восстановленный)	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HBV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HBV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции ДНК	50[1] мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 200 мкл образца		
Исследуемые образцы	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО B Lyo (восстановленный)	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HBV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HBV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 1000 мкл образца		
Исследуемые образцы	1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО B Lyo (восстановленный)	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	1000 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HBV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HBV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку

[1] При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью HBV Lyo** для проведения амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.
2. Внести в пробирки с **ПЦР-смесью HBV Lyo** образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 20 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Разбавитель	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ПЦР)
Пробы, экстрагированной из ПКО-1 HBV Lyo *(только при количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК1 (положительного контроля)
Пробы, экстрагированной из ПКО-2 HBV Lyo *(при качественном или количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК2 (положительного контроля)

3. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[2]	

Примечания

1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

4. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
5. Установить стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.
6. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

[2] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

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

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;
- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

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