



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ОО «ТестГен»
А.Н. Тороповский
«15» августа 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для качественного и количественного
определения РНК вируса гепатита D в образцах
плазмы крови человека методом полимеразной цепной
реакции в реальном времени с гибридизационно-
флуоресцентной детекцией с обратной транскрипцией
(ОТ-ПЦР-РВ) «HEPA-D-тест-Q»
по ТУ 21.20.23-020-97638376-2020**



ТУ 21.20.23-020-97638376-2020

Содержание

Список сокращений	4
Введение.....	5
1. Назначение.....	6
2. Принцип метода	7
3. Состав набора реагентов	9
4. Характеристики набора реагентов	11
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов	20
6. Меры предосторожности при работе с набором	21
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	23
8. Анализируемые образцы	25
9. Подготовка компонентов набора для исследования.....	29
10. Проведение анализа	30
10. Регистрация и интерпретация результатов.....	32
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов	37
13. Утилизация	38
14. Гарантийные обязательства, контакты	39
Приложение А.....	40

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ОТ	обратная транскрипция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	комплиментарная ДНК
РНК	рибонуклеиновая кислота
HDV	вирус гепатита D
ВКО	внутренний контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
КО-1	калибровочный образец № 1
КО-2	калибровочный образец № 2
КОЧ	контрольный образец для определения чувствительности
КОС	контрольный образец специфичности

Введение

Вирус гепатита D – потенциально опасная для жизни инфекция, может приводить к развитию хронической болезни печени и создавать высокий риск смерти. Вирус гепатита D при коинфекции или суперинфекции с гепатитом В значительно осложняет течение заболевания. Оценка вирусной нагрузки гепатита D позволяет скорректировать терапию и проводить мониторинг её эффективности.

Целевой анализ: специфичные участки геномной РНК вируса гепатита D (hepatitis D, hepatitis delta, HDV, ВГД).

Научная обоснованность целевого анализа заключается в его специфичности (уникальности последовательности РНК) в отношении геномов вируса гепатита D.

Вирус гепатита D – представитель рода Deltavirus (семейство не определено). Геном представлен кольцевой одноцепочечной молекулой РНК длиной около 1700 нуклеотидов. Для репликации вируса требуется присутствие вируса гепатита В.¹

HDV-инфекция может протекать в двух формах: коинфекции и суперинфекции. Коинфекцией называется инфекционный процесс, когда происходит одновременное заражение вирусами гепатита В и D. Суперинфекция – это инфекционный процесс, который развивается при заражении вирусом гепатита D больного хроническим гепатитом В или носителя вируса гепатита В. Коинфекция носит характер острого тяжелого заболевания с высоким риском развития фульминантного гепатита (до 20%). При суперинфекции, когда заболевание наслаивается на уже измененную ткань печени, в 70-80% случаев инфекция ведет к быстрому развитию цирроза.

Размножение вируса гепатита D подавляет размножение вируса гепатита В в клетках печени (феномен вирусной интерференции). Вследствие этого многие серологические маркеры могут быть не обнаружены в крови обследуемого или их концентрация может быть снижена.

Распознавание HDV-инфекции на фоне гепатита В весьма важно, поскольку течение болезни, терапевтические подходы и

¹ Гепатит D. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Информационный бюллетень, 2020.

прогноз при гепатите D отличаются от таковых при гепатите B без гепатита D. Количественное определение РНК вируса гепатита D в плазме крови необходимо проводить в процессе терапии. Определение вирусной нагрузки позволяет определить стадию заболевания, выявить активность процесса, мониторировать эффективность противовирусной терапии.

Область применения набора реагентов: клиническая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний.

Показания и противопоказания к применению

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

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

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

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

1.1. Назначение: набор реагентов «HEPA-D-тест-Q» предназначен для качественного и количественного определения РНК вируса гепатита D (hepatitis D, hepatitis delta, HDV, ВГД) методом одностадийной аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в пробе РНК, выделенной из плазмы крови К2-ЭДТА человека, у пациентов с подозрением на инфицирование вирусным гепатитом D и пациентов с выявленным вирусом гепатита D для выбора адекватной терапии и оценки её эффективности.

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

Потенциальные потребители медицинского изделия

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

2. Принцип метода

Метод

Одностадийная аллель-специфическая полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ).

Тип анализируемого образца

Материалом для исследования являются пробы РНК, выделенные из плазмы крови К2-ЭДТА человека.

Принцип определения

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

1. Подготовка ОТ-ПЦР;

2. Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация РНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;

3. Интерпретация результатов.

С пробами РНК проводятся реакции одностадийной обратной транскрипции и амплификации специфических участков при помощи специфичных к ним праймеров в реакционном буфере.

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

В составе смесей олигонуклеотидов присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой РНК-мишени и гидролизуются (разрушаются) *Taq*-полимеразой, в результате чего разобщаются краситель и тушителем, и происходит нарастание интенсивности флуоресценции по соответствующему диапазону оптического спектра. Это позволяет регистрировать

накопление специфичного продукта амплификации путём измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

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

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

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

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору	
FAM / Green	HEX / Yellow
РНК вируса гепатита D	ВКО

Ограничения метода

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

Набор реагентов по истечении срока годности применению не подлежит.

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

Набор реагентов, транспортированный или хранившийся с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах исследования с использованием данного МИ. В диагностических целях результаты должны использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, данными лабораторных исследований и другими тест-системами

(например, определение концентрации анти-HDV с помощью иммуноферментного или иммунохемилюминесцентного анализа), применяемой терапии.

При очень низкой вирусной нагрузке (менее 40 МЕ/мл), которая может быть обусловлена применяемой противовирусной терапией или особенностями течения заболевания, возможно получение ложноотрицательных результатов. В этих случаях рекомендовано использование большего объема клинического материала для выделения НК для понижения порога чувствительности тест-системы.

Время проведения ОТ-ПЦР составляет от 120 до 145 минут (без учета пробоподготовки), в зависимости от используемого амплификатора.

3. Состав набора реагентов

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

Количество анализируемых проб

Набор реагентов «HEPA-D-тест-Q» рассчитан на 96 реакций, что соответствует определению 88 исследуемых образцов, калибровочных образцов, отрицательных и положительных контрольных образцов при единичном запуске амплификатора на 96 лунок или 10 единичным постановкам исследуемых образцов с калибровочными, отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Состав набора реагентов

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

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1.	ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2.	Смесь олигонуклеотидов	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 1 440 мкл
3.	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 50 мкл
4.	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1 000 мкл

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
5.	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 950 мкл
6.	КО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1 500 мкл
7	КО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1 500 мкл

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

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

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

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

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

ВКО готов к использованию и представляет собой препарат армированной РНК.

КО-1 представляет собой смесь плазмидных РНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов РНК

вируса гепатита D с концентрацией с концентрацией 188679 МЕ/мл в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

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

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

4. Характеристики набора реагентов

4.1. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Набор реагентов «HEPA-D-тест-Q»

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
1. Технические характеристики		1
1. Внешний вид		
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
КО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
КО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-020-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.9
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-020-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.9
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-020-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.9
2. Функциональные характеристики		
2.1 Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM Ct≤30, HEX Ct≤30.	Раздел 7, пункт 7.7.2

2.2 Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM Ct > 35 или не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), а по каналу HEX Ct ≤ 32.	Раздел 7, пункт 7.7.2
2.3 Прохождение реакции в пробирках с КОС	В пробирках с КОС по каналу FAM Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), а по каналу HEX Ct ≤ 32.	Раздел 7, пункт 7.7.2
2.4 Прохождение реакции в пробирках с КОЧ	В пробирках с КОЧ по каналу FAM во всех повторях (не менее 4) Ct ≤ 35 и при значении стандартного отклонения в повторях КОЧ не более 5%, а по каналу HEX Ct ≤ 32.	Раздел 7, пункт 7.7.2
2.5 Тест на "линейность"	Коэффициент корреляции КО-1, КО-2 и стандартного образца (СО) не менее 0,98	Раздел 7, пункт 7.7.2
2.6 Тест на прецизионность: коэффициент вариации (КВ) в условиях повторяемости	Коэффициент вариации Ct у повторов каждого калибровочного образца КО-1 и КО-2 в условиях повторяемости составляет не более 5%.	Раздел 7, пункт 7.7.2
2.7 Тест на правильность определения концентрации	Полученное значение концентрации РНК вируса гепатита D должно соответствовать концентрации, приведённой в паспорте стандартного образца СОП с допуском ±0,4 lg концентрации.	Раздел 7, пункт 7.7.2

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

- контрольный образец для определения чувствительности (КОЧ), представляющий собой смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента геномной кДНК вируса гепатита D и фрагмента генома бактериофага в 10 % ТЕ-буфере (10 mM Трис, 1 mM ЭДТА) с концентрацией 250 копий в 1 мл каждой.

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

В случае неисправности медицинского изделия, отклонений в его функционировании, которые могут влиять на безопасность. изменений аналитических характеристик изделия незамедлительно прекратить применение медицинского изделия и сообщить производителю (см. раздел 14 Инструкции).

4.2. Характеристики аналитической эффективности

4.2.1. Аналитическая специфичность

Набор реагентов «HEPA-D-тест-Q» специфичен по отношению к геномной РНК гепатита D (hepatitis D, hepatitis delta, HDV, ВГД).

Для набора реагентов «HEPA-D-тест-Q» в качестве областей для гибридизации праймеров и зондов производителем выбраны области фрагмента не кодирующей РНК вблизи последовательности рибозима РНК вируса гепатита D.

4.2.1.1. Подтверждение специфичности in vitro с помощью международного стандарта ВОЗ: 1-й Международный стандарт Всемирной организации здравоохранения для анализа РНК вируса гепатита D для методов амплификации нуклеиновых кислот (NAT) (1st World Health Organization International Standard for Hepatitis D Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays), PEI code 7657/12, с концентрацией 575 000 МЕ/мл.

Для проведения исследования использовали Амплификатор QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США), Регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8446 от 06 июня 2019 года.

Коэффициент корреляции составил **0,9911**, что соответствует высокой силе корреляционной связи концентрации РНК HDV в стандартных образцах, полученной при помощи **испытываемого МИ «Набор реагентов для качественного и количественного определения РНК вируса гепатита D в образцах плазмы крови человека методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) «HEPA-D-тест-Q» по ТУ 21.20.23-020-97638376-2020**», производства ООО «ТестГен» и ожидаемой концентрации РНК HDV в стандартных образцах панели, приготовленной с использованием 1-го Международного стандарта Всемирной организации здравоохранения для анализа РНК вируса гепатита D для методов амплификации нуклеиновых кислот (NAT) (1st World Health Organization International Standard for Hepatitis D Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays), PEI code 7657/12, с концентрацией 575 000 МЕ/мл

Максимальное отклонение средней концентрации (log10 МЕ/мл) полученной набором реагентов «HEPA-D-тест-Q» в двух

повторах от ожидаемой концентрации для стандартных образцов составило $-0,18 \log_{10}$ от $\log_{10}$ концентрации.

4.2.1.2. Аналитическая специфичность: оценка перекрестной реактивности

По результатам оценки перекрестной реактивности, проведенной при исследовании НК штаммов следующих микроорганизмов и вирусов в концентрации не более 1×10^5 копий/мл и не менее 1×10^3 копий/мл:

- стандартные образцы из коллекции NIBSC: вирус гепатита А (NIBSC code: 00/562), вирус гепатита В (NIBSC code: 10/264), вирус гепатита С (NIBSC code: 14/150), вирус иммунодефицита человека 1 типа (NIBSC code: 16/194), цитомегаловирус (NIBSC code: 09/162), вирус Эпштейна-Барр (NIBSC code: 09/260), вирус ветряной оспы (NIBSC code: W1044), вирус герпеса человека типа 6 (NIBSC code: 15/266), парвовирус В19 ((NIBSC code: 99/800), вирус простого герпеса 1 типа (NIBSC code: 16/368), вирус простого герпеса 2 типа (NIBSC code: 17/122)

- штаммы микроорганизмов коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* Group A ATCC 19615, *Streptococcus agalactiae* Group B ATCC 13813

с помощью исследуемого набора реагентов «HEPA-D-тест-Q» в соответствии с интерпретацией результатов, изложенной в инструкции по применению, для всех исследованных образцов получены **отрицательные результаты**.

Получение отрицательных результатов подтверждает **отсутствие неспецифических положительных результатов** по отношению к НК следующих организмов и вирусов: вирусы гепатитов А, В, С, вирус иммунодефицита человека 1 типа, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса 1 и 2 типов, вирус герпеса 6 типа, вирус ветряной оспы, парвовирус В19, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*.

4.2.1.3. Аналитическая специфичность: проверка эффекта потенциально интерферирующих веществ

Перечень проверенных потенциально интерферирующих веществ приведен в разделе 8.3 Инструкции.

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

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

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

Прочие интерферирующие вещества в валидированных концентрациях интерферентов не оказывают влияние на результаты качественного и количественного определения РНК вируса гепатита D с помощью исследуемого набора «HEPA-D-тест-Q».

4.2.2. Предел обнаружения (LOD)

По результатам исследования предел обнаружения РНК HDV в образцах плазмы крови К2-ЭДТА:

- объемом **100 мкл** с частотой выявления 95 % для амплификатора ДТпрайм – 39,4 МЕ/мл (95%ДИ: 34,0-44,7), CFX 96 – 39,9 МЕ/мл (95%ДИ: 34,5-45,2), Rotor-Gene Q – 39,7 МЕ/мл (95%ДИ: 34,3-45,0), Quant Studio 5 – 39,9 МЕ/мл (95%ДИ: 34,5-45,2),

- объемом **1000 мкл** с частотой выявления 95% для амплификатора ДТпрайм – 8,20 МЕ/мл (95%ДИ: 6,77–9,63), CFX 96 – 8,79 МЕ/мл (95%ДИ: 7,36–10,22), Rotor-Gene Q – 8,93 МЕ/мл (95%ДИ: 7,50–10,36), Quant Studio 5 – 9,13 МЕ/мл (95%ДИ: 7,70–10,56).

4.2.3. Предел количественного определения (LOQ) в образцах плазмы крови К2-ЭДТА: По результатам исследования предел количественного определения (LOQ) РНК HDV в образцах плазмы крови К2-ЭДТА:

- объемом **100 мкл** с частотой выявления 95 % для амплификатора ДТпрайм – 112,7 МЕ/мл (95%ДИ: 102,3 – 123,8), CFX 96 – 112,5 МЕ/мл (95%ДИ: 102,7 – 124,2), Rotor-Gene Q – 112,5 МЕ/мл (95%ДИ: 95%ДИ: 101,7-123,2), Quant Studio 5 – 112,9 МЕ/мл (95%ДИ: 101,3 – 122,8).

- объемом 1000 мкл с частотой выявления 95% для для амплификатора ДТпрайм – 12,9 МЕ/мл (95%ДИ: 10,0 – 15,7), CFX 96 – 13,1 МЕ/мл (95%ДИ: 10,2 – 15,9), Rotor-Gene Q – 14,0 МЕ/мл (95%ДИ: 11,1-16,8), Quant Studio 5 – 12,9 МЕ/мл (95%ДИ: 10,0-15,7).

4.2.4. Линейный диапазон измерения исследуемого набора реагентов «HEPA-D-тест-Q»:

- в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл: линейный диапазон от 113 МЕ/мл до $1,36 \cdot 10^7$ МЕ/мл и демонстрируют максимальное отклонение от линии регрессии не выше чем $\pm 0,23 \log_{10}$.

- в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 1000 мкл: линейный диапазон от 20 МЕ/мл до $1,36 \cdot 10^7$ МЕ/мл и демонстрируют максимальное отклонение от линии регрессии не выше чем $\pm 0,21 \log_{10}$.

4.2.5. Метрологическая прослеживаемость контрольных образцов – ПКО, КО-1, КО-2, входящих в состав набора реагентов «HEPA-D-тест-Q», а также СОП «Контрольный образец РНК вируса гепатита D», КОЧ, используемые для проведения контроля качества готового набора «HEPA-D-тест-Q», проведена с использованием 1-го Международного стандарта Всемирной организации здравоохранения для анализа РНК вируса гепатита D для методов амплификации нуклеиновых кислот (NAT) (1st World Health Organization International Standard for Hepatitis D Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays), PEI code 7657/12. Приписанная концентрация КО-1 составляет 161290 МЕ/мл, КО-2 – 483 МЕ/мл, ПКО – 1612903 МЕ/мл, СОП – 1612 МЕ/мл, КОЧ – 40 МЕ/мл.

На основе полученных результатов процесса калибровки и стандартизации можно заключить, что набор реагентов «HEPA-D-тест-Q» обеспечивает количественные значения для 1-го Международного стандарта Всемирной организации здравоохранения для анализа РНК вируса гепатита D для методов амплификации нуклеиновых кислот (NAT) (1st World Health Organization International Standard for Hepatitis D Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays), PEI code 7657/12, которые аналогичны ожидаемым значениям с отклонением не более $\pm 0,13 \log_{10}$ МЕ/ мл (неопределенность).

4.2.6. Прецизионность в условиях повторяемости и воспроизводимости:

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

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

4.3. Характеристики клинической эффективности

В Российской Федерации отсутствует зарегистрированный в установленном порядке набор для количественного определения РНК вируса гепатита D в образцах плазмы крови человека, в связи с этим в качестве положительных клинических образцов рассматривались образцы плазмы крови человека отрицательные по содержанию вируса гепатита D с добавлением в различных концентрациях международного стандарта ВОЗ: 1-й Международный стандарт Всемирной организации здравоохранения для анализа РНК вируса гепатита D для методов амплификации нуклеиновых кислот (NAT) (1st World Health Organization International Standard for Hepatitis D Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays), PEI code 7657/12.

Для проведения клинических испытаний (в форме клинико-лабораторных испытаний медицинского изделия) было использовано 40 рекомбинантных положительных клинических образцов, приготовленных с использованием международного стандарта ВОЗ (PEI code 7657/12,) в различных концентрациях из линейного диапазона.

Такое количество образцов было набрано в соответствии с рекомендациями Международного руководства CLSI EP09-A3, а также в соответствии с требованиями ГОСТ Р 51352-2013.

Каждый образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «HEPA-D-тест-Q».

Для проведения ПЦР-исследования с помощью исследуемого набора «HEPA-D-тест-Q» были использованы амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

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

- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия);

- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США).

Выделение РНК из клинических образцов осуществлялось с помощью набора для экстракции РНК:

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

4.3.1 Результаты изучения диагностических характеристик по образцам клинического материала представлены в таблице 4.

Таблица 4

Вид исследуемого материала	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Плазма крови	80	74	100% (95% ДИ: 95,49%-100%)	100% (95% ДИ: 95,14%-100%)

4.3.2 Сравнение методов: точность.

Данные, полученные при тестировании **40 образцов плазмы крови человека** (с содержанием ЭДТА-K2 в качестве антикоагулянта) с добавлением в различных концентрациях международного стандарта ВОЗ: 1-й Международный стандарт Всемирной организации здравоохранения для анализа РНК вируса гепатита D для методов амплификации нуклеиновых кислот (NAT) (1st World Health Organization International Standard for Hepatitis D Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays), PEI code 7657/12, позволяют сделать вывод о достоверном соответствии результатов количественного определения концентрации РНК вируса гепатита D в клинических образцах, полученных с помощью **испытываемого набора реагентов «НЕРА-D-тест-Q»** и ожидаемых результатов концентрации исследуемых образцов при проведении ПЦР-анализа с использованием **амплификаторов:**

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

Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2008/03399 от 21 июня 2016 года;

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

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

Систематическая погрешность измерения логарифма концентрации РНК ВИЧ-1 не превышает 3 %.

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

	Тип образца	Ед. изм.	Используемый амплификатор	Кол-во проб	Кэфф. коррел.	Пересечение	Наклон
Набор реагентов «НЕРА-D-тест-Q», производства ООО «ТестГен» в сравнении с ожидаемыми концентрациями разведения образца ВОЗ: 1st World Health Organization International Standard for Hepatitis D Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays, PEI code 7657/12	Плазма крови человека (с содержанием ЭДТА-K2 в качестве антикоагулянта)	log10 МЕ/мл	ДТпрайм	40	0,9992	0,0143	0,9956
			CFX 96	40	0,9994	-0,0196	1,0032
			Rotor-Gene Q	40	0,9989	0,002	0,9991
			Quant Studio 5	40	0,999	-0,0234	1,0054

4.3.3 Результаты определения межлотовой корреляции (плазма крови K2-ЭДТА человека).

Для **определения межлотовой корреляции** результатов измерений в клинических образцах в соответствии с международным руководством CLSI EP09-A3 строилась диаграмма рассеяния зависимой переменной X – концентрация РНК вируса гепатита D с использованием испытываемого набора «НЕРА-D-тест-Q», производства ООО «ТестГен», LOT: 202207-356, и Y – концентрация

РНК вируса гепатита D с использованием испытуемого набора «HEPA-D-тест-Q», производства ООО «ТестГен», LOT: 202207-357.

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

	Тип образца	Ед. изм.	Используемый амплификатор	Кол-во проб	Кэфф. коррел.	Пересечение	Наклон
Набор реагентов «HEPA-D-тест-Q», производства ООО «ТестГен» LOT: 202207-356 в сравнении с LOT: 202207-357	Плазма крови человека (с содержанием ЭДТА-K2 в качестве антикоагулянта)	log10 МЕ/мл	ДТпрайм	40	0,9953	0,0057	1,0003
			CFX 96	40	0,9958	-0,0425	1,0107
			Rotor-Gene Q	40	0,997	0,0612	0,9834
			Quant Studio 5	40	0,9956	-0,0285	1,0043

Коэффициент корреляции R^2 при проведении анализа на каждом из используемых амплификаторов составил более **0,99**. В соответствии с рекомендациями документа CLSI EP09-A3 с использованием метода регрессии и корреляции можно сделать вывод о высокой силе корреляционной связи концентрации РНК вируса гепатита D в клинических образцах, полученных при помощи **двух лотов испытуемого МИ** «Набор реагентов для качественного и количественного определения РНК вируса гепатита D в образцах плазмы крови человека методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) «HEPA-D-тест-Q» по ТУ 21.20.23-020-97638376-2020», производства ООО «ТестГен».

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. Потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
2. Загрязнение клинического материала ингибирующими веществами в концентрациях, превышающих допустимые;

3. Контаминация реакционных смесей и образцов исследуемой РНК содержимым из пробирки ПКО или продуктами амплификации;

4. Проведение анализа с использованием пробы РНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);

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

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

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для качественного и количественного определения РНК вируса гепатита D в образцах плазмы крови человека методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) «HEPA-D-тест-Q» по ТУ 21.20.23-020-97638376-2020» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

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

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

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

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

Работу с материалом, заражённым или подозрительным на заражённость, проводят в соответствии с требованиями СанПиН

3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

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

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может

привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов;

– применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

– допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА I–II групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также лаборант со средним специальным медицинским образованием);

– не использовать набор по истечении срока годности;

– не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию;

– избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой; при контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

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

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

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

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Вортекс;
3. Дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объёмы жидкости 20–200 мкл, 200–1000 мкл
4. Холодильник от 2 °C до 8 °C с морозильной камерой не выше минус 16 °C;

5. Амплификатор² с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green и HEX/Yellow: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм», (ООО «НПО РНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, Ахуген, США);
2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 или 2,0 мл;
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) или оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенку пробирки) для ПЦР: пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл³, или пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, Ахуген, США), совместимые с используемым амплификатором;
4. Халат и одноразовые перчатки без талька;
5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;
6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл;
7. Набор для выделения РНК из плазмы крови K2-ЭДТА (см. п. 8.2 Инструкции).

² Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

³ Убедитесь в совместимости пробирок для ПЦР с используемым

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для исследования являются пробы РНК, выделенные из плазмы крови K2-ЭДТА человека.

8.1. Процедура получения клинического материала

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

Забор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами II группы патогенности.

Забор материала на исследование

Взятие периферической крови проводится утром натощак в пробирку (вакуумную пробирку), содержащую раствор EDTA-K2 в качестве антикоагулянта, объемом 4 или 6 мл. Сразу после взятия крови пробирку перевернуть 3–4 раза для перемешивания крови с раствором EDTA-K2.

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

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

Условия транспортирования и хранения исходного клинического материала – крови:

- при температуре от +2 °C до +8 °C – не более 6 часов;
- при комнатной температуре – не более 2 часов.

Кровь не замораживать.

В течение 2 часов (при хранении при комнатной температуре) или 6 часов (при хранении при температуре от +2 °C до +8 °C) после забора материала следует отобрать плазму, для чего пробирку с кровью центрифугируют при 800–1600 g в течение 20 минут при комнатной температуре. После центрифугирования верхнюю

фракцию (плазму) перенести в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл, свободную от РНКаз.

Условия транспортирования и хранения плазмы крови К2-ЭДТА:

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

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов плазмы.

Для выделения РНК использовать не менее 100 мкл плазмы. Повышение аналитической чувствительности набора возможно благодаря использованию большего объема плазмы, если это предусмотрено используемым набором для выделения РНК.

Предварительная обработка материала

Подготовка не требуется.

Учет, хранение, передача и транспортирование клинического материала, подозрительного на наличие вируса гепатитов, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13), действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности.

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

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

Для выделения пробы РНК человека из плазмы крови рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

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

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

К объему плазмы, предназначенной для выделения РНК, следует добавить 10 мкл ВКО из набора реагентов «НЕРА-D-тест-Q».

Через этап выделения с добавлением 10 мкл ВКО проходят также ОКО и калибровочные образцы КО-1 и КО-2 в объеме 100 мкл. Если инструкцией производителя наборов реагентов для выделения РНК предусмотрено использование большего объема образца, следует довести объем ОКО, КО-1 и КО-2 до требуемого физиологическим раствором или ТЕ-буфером.

Условия возможного хранения анализируемых образцов РНК:

- при +2 ...+8 °С не более 4 ч (рекомендуется),
- при -18... -22 °С не более недели,
- при температуре не выше -80 °С не более года.

8.3. Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

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

Интерферирующие вещества могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

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

2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение клинического образца компонентами крови (гемоглобин, триглицериды, билирубин) может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения РНК;

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

Исследованные концентрации интерферирующих веществ приведены в таблице 5.

Таблица 5

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
--------------------------	---------------------------

Эндогенные интерферирующие вещества	
Гемоглобин	260 мкг/мл
Триглицериды	37 ммоль/л
Билирубин	210 мкмоль/л
Гепарин (антикоагулянт)	0,15 МЕ/мл
Цитрат натрия (антикоагулянт)	0,1 мМ/мл
EDTA-K2 (антикоагулянт)	0,5 мМ/мл
Экзогенные интерферирующие вещества	
При антикоагулянтной терапии	
Гепарин	1 МЕ/мл
Препараты, назначаемые при вирусном гепатите D	
Интерферон альфа	1000 МЕ/мл
Пегилированный интерферон альфа	0,036 мкг/мл
Бувиритид	$0,4 \cdot 10^{-3}$ мг/мл
Препараты, назначаемые при вирусном гепатите В	
Ламивудин	0,02 мг/мл
Энтекавир	$0,1 \cdot 10^{-3}$ мг/мл
Телбивудин	0,12 мг/мл

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

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

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

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

Ограничения по использованию анализируемого материала:

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

- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом;
- наличие гепарина в крови у пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии, может привести к получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови у таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

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

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

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

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

Для проведения качественного анализа:

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа РНК, ПЦР-буфером, смесью олигонуклеотидов, ОКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

2. Отобрать необходимое количество пробирок (с оптически прозрачными крышками или стенками – в зависимости от используемого типа детектирующего амплификатора) объёмом 0,1 или 0,2 мл для ПЦР из расчёта: количество исследуемых образцов + 1 х ПКО + 1 х ОКО.

Для проведения количественного анализа:

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

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

Возможна одновременная постановка качественного и количественного анализов по схеме подготовки компонентов для

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

1. Подготовка ОТ-ПЦР;

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

3. Интерпретация результатов.

А) Подготовка ОТ-ПЦР

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

Общий объём реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции.

Для приготовления реакционной смеси на 1 реакцию необходимо:

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

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл для ПЦР.
2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объёмом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: $(n+9) \times 5$ мкл ПЦР-буфера и $(n+9) \times 15$

мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов.

3. В каждую пробирку для ПЦР внести по 20 мкл приготовленной реакционной смеси.

4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 5 мкл выделенной РНК. В пробирки для ПКО и ОКО препарат РНК не вносится.

5. Для количественного анализа: в соответствующие пробирки для КО-1 и КО-2 добавить по 5 мкл калибровочных образцов, прошедших через этап выделения РНК (см. п. 8.2).

6. Внести в соответствующую пробирку 5 мкл ПКО.

7. Внести в соответствующую пробирку 5 мкл ОКО, прошедших через этап выделения РНК (см. п. 8.2).

8. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Б) Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация РНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;

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

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

Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Тип анализа: количественный со стандартами. Протокол ПЦР указан в таблице 7.

Указать количество и идентификаторы образцов, калибровочных образцов КО-1 и КО-2 с указанием их концентраций, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

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

2. Запустить ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

Таблица 6 – Протокол ПЦР

Стадия	Температура, °С	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	52	40:00	–	–
2	95	02:00	–	–
3	95	00:05	–	5
	60	00:15	–	
	67	00:30	–	
4	95	00:05	–	45
	60	00:15	FAM/Green, HEX/Yellow	
	67	00:30	–	

10. Регистрация и интерпретация результатов

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

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала детекции на уровне, соответствующем 5–20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t каналов FAM/Green и HEX/Yellow (табл. 1). Учитываются только значения C_t , полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 4 – см. табл. 5).

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

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

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для ОКО и ПКО должны быть получены следующие результаты (табл. 7).

Таблица 7 – Результаты исследования для ОКО и ПКО

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

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

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

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

Интерпретация результатов проводится автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого вместе с используемым детектирующим амплификатором, или вручную.

На основании полученных значений C_t для калибровочных образцов и их концентраций необходимо произвести построение калибровочной прямой. При использовании калибровочной прямой производится вычисление концентраций анализируемых образцов. Для образцов учитываются значения $C_t \leq 35$ по каналу FAM. При получении для образцов значения $C_t > 35$ (при значении C_t у ВКО ≤ 32), результат считается сомнительным.

Для количественного анализа: эффективность ПЦР должна быть более 90%, разница между значениями C_t у повторов каждого калибровочного образца, КО-1 и КО-2, должна быть не более 1. В

противном случае необходимо заново провести анализ, начиная с этапа выделения РНК. В случае, если один из трёх дублей КО-1 или КО-2 имеет резко отклоняющееся от остальных значение C_t , допускается его игнорирование при построении калибровочной прямой. Если для экстракции РНК использовался объём плазмы, превышающий 100 мкл (при сохранении объёма калибровочных образцов, взятых для выделения РНК), следует произвести пересчёт полученной концентрации РНК гепатита D: умножить полученное значение концентрации на соотношение $100/V$, где V – используемый объём плазмы для выделения РНК. Точность измерений: $\pm 0,4 \lg$ концентрации.

Принципы интерпретации результатов качественного анализа отражены в таблице 8.

Принципы интерпретации результатов количественного анализа в образцах плазмы крови К2-ЭДТА объемом 100 мкл и 1000 мкл отражены в таблице 9 и 10.

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

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

Таблица 8 – Принцип интерпретации результатов качественного анализа в исследуемых клинических образцах плазмы крови К2-ЭДТА

Каналы, соответствующие флуорофорам		Интерпретация результата
FAM/Green (HDV), ME/мл	HEX/Yellow (BKO), C_t	
≤ 35	не уч.	РНК вируса гепатита D обнаружена
–	≤ 32	РНК вируса гепатита D не обнаружена
–	> 32	невалидный результат
> 35	не уч.	сомнительный результат

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

Таблица 9 – Принцип интерпретации результатов количественного анализа в исследуемых клинических образцах плазмы крови К2-ЭДТА объёмом 100 мкл

Каналы, соответствующие флуорофорам		Интерпретация результата
FAM/Green (HDV), ME/мл	HEX/Yellow (BKO), C_t	
$113 - 1,36 \times 10^7$	не уч.	положительный результат с указанием конкретной концентрации в ME/мл
$< 113 \times 10^2$	не уч.	положительный результат с указанием «менее 113 ME/мл»
$> 1,36 \times 10^7$	не уч.	положительный результат с указанием «более $1,36 \times 10^7$ ME/мл»
–	≤ 32	отрицательный результат (концентрация не указана)
–	–	невалидный результат

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

Таблица 10 – Принцип интерпретации результатов количественного анализа в исследуемых клинических образцах плазмы крови К2-ЭДТА объёмом 1000 мкл

Каналы, соответствующие флуорофорам		Интерпретация результата
FAM/Green (HDV), ME/мл	HEX/Yellow (BKO), C_t	
$20 - 1,36 \times 10^7$	не уч.	положительный результат с указанием конкретной концентрации в копиях/мл
$< 20 \times 10^2$	не уч.	положительный результат с указанием «менее 20 ME/мл»
$> 1,36 \times 10^7$	не уч.	положительный результат с указанием «более $1,36 \times 10^7$ ME/мл»
–	≤ 32	отрицательный результат (концентрация не указана)
–	–	невалидный результат

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

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

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

Диагностическое значение полученного результата исследования:

Полученный результат анализа может быть использован квалифицированным специалистом (врачом), с учётом данных клинической картины и других видов исследований в совокупности, для диагностики вирусного гепатита D, определения адекватной терапии и оценки её эффективности.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

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

Допускается заморозка/оттаивание набора «HEPA-D-тест-Q» не более 10 раз.

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

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

Транспортирование

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

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

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

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

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

Срок годности

Срок годности набора реагентов «HEPA-D-тест-Q» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при

соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истёкшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

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

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

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

13. Утилизация

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

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

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

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

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

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

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует качество и безопасность набора реагентов «HEPA-D-тест-Q» в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования и хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с ограниченной ответственностью «ТестГен»

(ООО «ТестГен»),

432072, г. Ульяновск, 44-й Инженерный проезд, дом 9, офис 13

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Приложение А

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2011	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.
ГОСТ Р EN 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем(маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования