

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



В.Г. Акимкин

«02» февраля 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV)
в клиническом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® HBV-FL»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru



ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ.....	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	7
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	10
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	11
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	11
СОСТАВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	14
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	14
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	15
А. Подготовка проб для амплификации.....	15
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»..	17
В. Анализ и интерпретация результатов.....	19
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	23
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	25
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	26

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	– внутренний контрольный образец
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	– положительный контроль ПЦР
К–	– отрицательный контроль ПЦР
МЕ	– международная единица
МУ	– методические указания
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПК	– положительный контроль экстракции
ПКО	– положительный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
СанПиН	– санитарные правила и нормы
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Ct	– cycle threshold (пороговый цикл)
FL	– ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
HBV	– вирус гепатита В
HCV	– вирус гепатита С
HDV	– вирус гепатита D («Дельта»)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® HBV-FL» предназначен для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из плазмы крови.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала с целью выявления ДНК вируса гепатита В.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемого вируса и ДНК ВКО с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

Амплификация участка ДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды комплементарные участкам амплифицируемых ДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация двух ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	ДНК ВКО	ДНК HBV
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	gene C

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 4: «ПЦР-комплект» вариант FRT

Примечание – Формы 1, 2, 3 удалены.

Форма 4 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 4 рассчитана на проведение 112 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Таблица 2

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), МЕ/мл
Плазма крови	100	«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	100
		«РИБО-преп»		50
	200	«МАГНО-сорб»		50
	1000	«МАГНО-сорб»		10

Данные значения характеристик достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает ДНК *HBV*.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана посредством добавления в реакцию ДНК человека, а также геномной ДНК/РНК следующих микроорганизмов и вирусов в концентрации порядка 1×10^3 копий/мл или выше: вирус гепатита А, вирус гепатита С, вирус гепатита D, вирус иммунодефицита человека 1 типа, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса типы 1, 2, вирус ветряной оспы, вирус герпеса человека 6 типа, парвовирус B19, аденовирус 2 типа, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных

микроорганизмов/вирусов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Информация об интерферирующих веществах указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой разведения стандартного образца предприятия, содержащего ДНК *HBV* в концентрации выше предела обнаружения. В качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах разных серий набора реагентов. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	10	100	40	100
Отрицательные	10	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы:

- 50 образцов плазмы крови от доноров с отсутствием маркеров вирусных гепатитов (HBsAg, anti-HCV) и маркеров синдрома цитолиза (АЛТ, АСТ);
- 50 образцов плазмы крови пациентов с диагнозом «хронический вирусный гепатит В». Наличие ДНК *HBV* подтверждено при тестировании с помощью набора реагентов «АмплиСенс® HCV / HBV / HIV-FL».

Таблица 4

**Результаты тестирования набора реагентов
«АмплиСенс® HBV-FL» в сравнении с референтным методом**

Вид исследуемого материала	Результаты применения «АмплиСенс® HBV-FL»		Результаты применения референтного метода ¹	
			положительных	отрицательных
Плазма крови	Всего использовано 100 образцов	положительных	50	0
		отрицательных	0	50

Таблица 5

**Диагностические характеристики набора реагентов
«АмплиСенс® HBV-FL»**

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
Плазма крови	100 (92,89 – 100) %	100 (92,89 – 100) %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», 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» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

¹ В качестве референтного метода использовался набор реагентов «АмплиСенс® HCV / HBV / HIV-FL» (ПУ № ФСР 2009/06187).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов 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.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности форма 4 набора реагентов безопасна.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком

годности, использованные реагенты, упаковку², биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять 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».

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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Вакуумная система забора крови типа Vacuette.
2. Центрифуга медицинская с принадлежностями.
3. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

4. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «РИБО-сорб» (РУ № ФСР 2008/03993), «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» вариант 100-200 или вариант 100-1000 (РУ № ФСР 2010/07265).
5. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 мкл.
7. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл.
8. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс, УФ-бокс) или бокс микробиологической безопасности II класса

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

защиты).

9. Центрифуга-вортекс.

10. Автоматические дозаторы переменного объема.

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

12. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.

13. Емкость для сброса наконечников.

14. Одноразовые полипропиленовые пробирки:

а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;

б) 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 – при использовании прибора планшетного типа;

в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.

15. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399)), ДТ-96 / «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01250, РУ № ФСР 2011/10229)).

16. ПО для запуска амплификации и автоматической обработки результатов AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) версия 1.0.0 или выше.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служит плазма крови.

Взятие крови проводится утром натощак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой диаметром 0,8–1,1 мм в пробирку с 6 % раствором ЭДТА (K₂ЭДТА или K₃ЭДТА) или с цитратом натрия в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают вверх дном, чтобы кровь в пробирке

тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется, и экстракция ДНК станет невозможной) и хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 6 ч. Пробирку с цельной кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g при комнатной температуре. Полученную плазму переносят в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 2,0 мл.

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование плазмы крови при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток.

Допускается использование сыворотки крови. Диагностическая чувствительность ввиду осаждения вирусных частиц при ретракции сгустка может быть существенно снижена. Хранить сыворотку можно не более 3 суток при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы плазмы крови не требуют предварительной подготовки.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля эффективности экстракции ДНК и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО STI 87), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК

ВКО STI 87, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Ограничения по использованию проб

Непригодными для исследования являются:

- образцы плазмы крови с гемолизом;
- образцы плазмы крови, подвергшиеся многократному замораживанию-оттаиванию;
- образцы плазмы крови, полученные из образцов крови, взятой в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале, используемом для исследования (см. табл. 6).

Были протестированы модельные образцы плазмы крови без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 6. Модельные образцы плазмы крови содержали стандартный образец предприятия, содержащий ДНК *HBV* в концентрации 500 МЕ/мл.

Таблица 6

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Эндогенные вещества	Гемоглобин	160 г/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено
		250 г/л	
	Триглицериды	3,7 ммоль/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено
		37 ммоль/л	
	Билирубин	21 мкмоль/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено
		210 мкмоль/л	
Экзогенные вещества	Белок	85 г/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено
		120 г/л	
	Лития гепарин ³	12 МЕ/мл	<u>Обнаружено</u>
	Калий ЭДТА ³	2 мг/мл	Не обнаружено

³ В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калия ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл, лития гепарин – в концентрации от 12 до 30 МЕ/мл.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации участка ДНК вируса гепатита В (HBV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FL HBV	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,3	4 пробирки
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	4 пробирки
KB2 HBV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ПКО-1-HBV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	4 пробирки

Программное обеспечение AmpliSens® HBV Soft версия 1 и руководство оператора – на электронном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыши к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб». Порядок работы с комплектами реагентов «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб» смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции, порядок работы с комплектом реагентов «РИБО-сорб» смотрите в Приложении А.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО STI-87**.

Объем ВКО STI-87 – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-HBV**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО STI-87**.

Объем ВКО STI-87 – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца:

- 200 мкл;
- 1000 мкл.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-1-HBV**.

Объем элюции – **70 мкл**.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме реального времени.

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

А. Подготовка проб для амплификации

Общий объем реакционной смеси – **25 мкл**, включая объем пробы ДНК – **10 мкл**.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-1-FL HBV**, **5 мкл ПЦР-буфера-В** и **0,5 мкл Полимеразы (TaqF)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на одну реакцию.

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

2. Разморозить все реагенты ПЦР-комплекта, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-1-FL HBV**, **ПЦР-буфера-В** и **Полимеразы (TaqF)**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

Приготовленная смесь не хранится.

4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с учетом количества исследуемых и контрольных образцов (см. табл. 7).
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. Используя наконечник с фильтром, в пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

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

7. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл пробы ДНК**, экстрагированной из ПКО-1-*HBV*.
- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл пробы ДНК**, экстрагированной из ОКО.
- в) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл KB2 HBV**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл буфера для элюции**.

Схема приготовления реакционных смесей

Объем реагента на одну реакцию, мкл		Объем реагентов на указанное количество исследуемых образцов с запасом на один образец		
		10,00	5,00	0,50
Число исследуемых образцов	Число проб в ПЦР ⁴	ПЦР-смесь-1-FL HBV	ПЦР-буфер-В	Полимераза (TaqF)
4	7	80	40	4,0
6	9	100	50	5,0
8	11	120	60	6,0
10 ⁵	13	140	70	7,0
12	15	160	80	8,0
14	17	180	90	9,0
16	19	200	100	10,0
18	21	220	110	11,0
20	23	240	120	12,0
22 ⁶	25	260	130	13,0
34	37	380	190	19,0
46	49	500	250	25,0

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

2. Запустить программу амплификации:
 - а) либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® HBV Soft.

Примечание — Детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) версии 1.0.0 и выше.

- б) либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения

⁴ Число исследуемых образцов + 2 контроля этапа экстракции ДНК + 1 контроль ПЦР (N+3, N - количество исследуемых образцов).

⁵ Панель из 12 пробирок на экстракцию.

⁶ Панель из 24 пробирок на экстракцию

программы, указанной в табл. 8 или 9, согласно инструкции по его применению.

Таблица 8

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-2 RG» для приборов роторного типа⁷

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold 1/Удерж. темп-ры 1	50	15 мин	—	1
Hold 2/Удерж. темп-ры 2	95	15 мин	—	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	—	5
	60	20 с	—	
	72	15 с	—	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	—	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	—	

ВНИМАНИЕ! С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HDV*, генотипирования *HCV* и др.). В случае если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК *HBV*, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Таблица 9

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-2 iQ» для приборов планшетного типа⁸

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	5 с	—	5
	60	20 с	—	
	72	15 с	—	
4	95	5 с	—	40
	60	30 с	FAM, JOE	
	72	15 с	—	

ВНИМАНИЕ! С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание

⁷ Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия).

⁸ Например, «ДТ-96» / «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).

тестов по единой программе (например, совместно с тестами для HDV, генотипирования HCV и др.). В случае, если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК HBV, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализ и интерпретацию полученных результатов проводят вручную с помощью ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» или в автоматическом режиме с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® HBV Soft версия 1. Порядок работы с ПО AmpliSens® HBV Soft версия 1 описан в руководстве оператора.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	ДНК ВКО	ДНК HBV

Для анализа и интерпретации результатов используют значения порогового цикла (C_t), полученные на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией. При использовании ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® HBV Soft значения C_t определяются автоматически.

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 11

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)		Результат
FAM	JOE	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	ДНК HBV НЕ обнаружена
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК HBV обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	Невалидный*

* В случае получения невалидного результата необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 12 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует

При наличии отклонений результатов для контролей, от указанных выше, интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции (ПК):

а) по каналу для флуорофора JOE значение порогового цикла (Ct) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для

исследуемых образцов, в которых не обнаружена ДНК *HBV*. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *HBV*, начиная с этапа экстракции ДНК.

- б) по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

2. Для положительного контроля ПЦР (К+):

- а) по каналу для флуорофора JOE значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов, в которых не обнаружена ДНК *HBV*. Необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *HBV*.

- б) по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или превышает граничное значение. Интерпретацию результатов для исследуемых образцов проводить согласно таблице 11.

3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):

- а) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе исследуемых образцов / реагентов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена ДНК *HBV*. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *HBV*, начиная с этапа экстракции ДНК.

- б) по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

4. Для отрицательного контроля ПЦР (К–):
 - а) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе исследуемых образцов / реагентов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена ДНК *HBV*. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *HBV*.
 - б) по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация исследуемых образцов / реагентов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации. Интерпретацию результатов для исследуемых образцов проводить согласно таблице 11.
5. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). При анализе результатов вручную необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии или при анализе результатов в автоматическом режиме, требуется повторно провести амплификацию для такого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Форма 4. «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Допускается хранение ПЦР-смеси-1-FL HBV, KB2 HBV, буфера для элюции, ОКО, ПКО-1-HBV и ВКО STI-87 при температуре ниже минус 24 °С. Не допускается замораживание/оттаивание KB2 HBV, ПКО-1-HBV и ВКО STI-87 более двух раз. После размораживания KB2 HBV, ПКО-1-HBV и ВКО STI-87 хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 мес. ПЦР-смесь-1-FL HBV хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции АмплиСенс® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно



Код партии



Содержимого достаточно
для проведения <n> тестов



Медицинское изделие для
диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по
применению или к
инструкции по применению в
электронном виде



Температурный диапазон



Не допускать воздействия
солнечного света



Верхняя граница
температурного диапазона



Дата изготовления



Изготовитель

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб»

1. Прогреть Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) при температуре 60°C до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая контроли экстракции). Промаркировать пробирки.
3. На дно каждой пробирки внести по 10 мкл ВКО STI-87.
4. В пробирки с ВКО внести по 450 мкл лизирующего раствора.

При большом количестве образцов для облегчения процедуры экстракции допускается смешивание в отдельном одноразовом флаконе лизирующего раствора и ВКО STI-87 (из расчета на один образец 450 мкл лизирующего раствора и 10 мкл ВКО) с последующим внесением по 450 мкл смеси в заранее подготовленные пробирки объемом 1,5 мл.

5. В пробирки внести по 100 мкл исследуемых образцов, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.
6. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) с лизирующим раствором и ВКО внести 90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-1-НВУ.
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) с лизирующим раствором и ВКО внести 100 мкл ОКО.
8. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить капли жидкости с крышек пробирок кратким центрифугированием.
9. Поместить пробирки с образцами и контролями в термостат с температурой 60 °С на 10 мин. Осадить капли конденсата с крышки кратким центрифугированием.
10. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента. Перемешать на вортексе, оставить на 10 мин при комнатной температуре, тщательно перемешивая каждые 2 мин.
11. Процентрифугировать пробирки для осаждения сорбента на центрифуге при 7 тыс g (например, 10 тыс. об/мин для

центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.

12. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 13. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 1. Плотнo закрыть крышки, перемешать на вортeксе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на центрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин.
 14. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 15. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3. Плотнo закрыть крышки, перемешать на вортeксе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на центрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин.
 16. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 17. Повторить отмывку раствором для отмывки 3, следуя п. 15-16.
 18. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 4. Плотнo закрыть крышки, перемешать на вортeксе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на центрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин.
 19. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 20. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре 60 °C на 12-15 мин для подсушивания сорбента.
 21. Добавить в пробирки по 50 мкл РНК-буфера. Закрыть пробирки и перемешать на вортeксе. Поместить в термостат при температуре 60 °C на 2-3 мин.
 22. Перемешать на вортeксе и осадить сорбент на центрифуге при 12-13 тыс g (например, 13,4 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.
- Отбор очищенной ДНК для проведения ПЦР проводить осторожно, не захватывая сорбент. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге при 12-13 тыс g в

течение 1 мин.

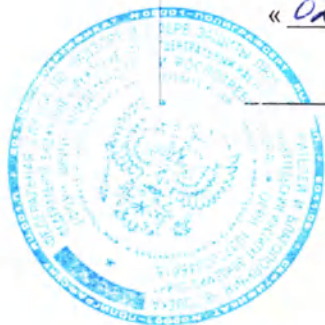
ДНК-пробы могут храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку. Допускается хранение препарата при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение года.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 28
двадцать восемь лист 06

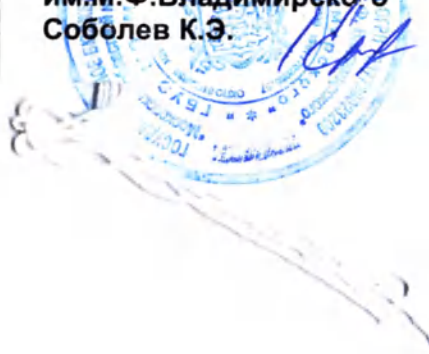
Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)


« 02 » 02 2024 г. А.О.Лисицына

М.П.



Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 28 листа(ов)
Директор ГБУЗ МО МОНИКИ
им.М.Ф.Владимирского
Соболев К.Э. 



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



В.Г. Акимкин

«12» Января 2024 г.

РУКОВОДСТВО ОПЕРАТОРА

по применению программного обеспечения
AmpliSens® HBV Soft

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ.....	3
УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ.....	4
Требования к техническим средствам оператора	4
Требования к входным данным.....	5
Требования к информационной безопасности	5
ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ.....	5
Загрузка ПО AmpliSens® HBV Soft в ПО AmpliSens® RealTime Soft.....	5
Формирование и запуск постановки.....	6
Анализ и интерпретация результатов	6
Авторизация результатов ПЦР-исследования.....	9
Формирование бланка с результатами	9
СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ	10
ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА И ИНФОРМАЦИЯ О РАЗРАБОТЧИКЕ.....	12

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем руководстве применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	– внутренний контрольный образец
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
Детектирующий амплификатор	– прибор для проведения амплификации с детекцией в режиме «реального времени»
ПО	– программное обеспечение, программа
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
Ct	– cycle threshold (пороговый цикл)
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПК	– положительный контроль экстракции
К-	– отрицательный контроль амплификации
К+	– положительный контроль амплификации
HBV	– вирус гепатита В

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Наименование ПО: AmpliSens® HBV Soft.

Версия ПО: 1 (номера минорных и незначимых изменений не указаны).

Способ размещения и доступа ПО: входит в состав набора реагентов «АмплиСенс® HBV-FL». ПО AmpliSens® HBV Soft и руководство оператора предоставляются на электронном носителе или сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Класс безопасности: Класс А в соответствии с п.4.3 ГОСТ IEC 62304.

Порядок нумерации версий ПО: Обозначение версии состоит из трех чисел, разделенных точками, означающих нумерацию мажорных, минорных и незначимых изменений соответственно. Мажорные изменения означают изменение функционального назначения, принципа работы, структуры и функций составных частей ПО; минорные изменения означают изменение названий и обозначений в информационном блоке ПО; незначимые изменения означают изменения (включая исправление ошибок) и доработки, не изменяющие функции, описанные для мажорных и минорных изменений.

Примечание – При обозначении версии ПО в составе набора реагентов «АмплиСенс® HBV-FL» номера минорных и незначимых изменений не указываются. Полная версия ПО, включая номера минорных и незначимых изменений, указана во вкладыше к набору реагентов и интерфейсе ПО.

ПО соответствует требованиям ГОСТ Р ИСО/МЭК 9126, ГОСТ 28195, ГОСТ Р 51188, п. 4.3 ГОСТ IEC 62304.

НАЗНАЧЕНИЕ

Программное обеспечение AmpliSens® HBV Soft предназначено для автоматического программирования детектирующего амплификатора, совместимого с ПО AmpliSens® RealTime Soft (далее – ПО ARTS), и автоматической обработки и интерпретации результатов ПЦР-исследования при использовании набора реагентов «АмплиСенс® HBV-FL» (далее – набор реагентов). ПО AmpliSens® HBV Soft представляет собой программу, содержащую критерии анализа кривых флуоресценции и алгоритм интерпретации результатов, а также информацию об анализатах, используемом биологическом материале, реагентах и контрольных образцах, программе амплификации, указанных в инструкции к набору реагентов.

ПРИНЦИП РАБОТЫ

Для работы ПО AmpliSens® HBV Soft необходимо ПО ARTS.

В соответствии с информацией об используемом биологическом материале, реагентах, контрольных образцах и программе амплификации, указанной в ПО AmpliSens® HBV Soft, ПО ARTS осуществляет запуск детектирующих амплификаторов. После завершения амплификации ПО ARTS визуализирует полученные флуоресцентные кривые и осуществляет автоматический экспорт полученных данных для контрольных и исследуемых образцов в ПО AmpliSens® HBV Soft.

ПО AmpliSens® HBV Soft проводит автоматическую интерпретацию результатов с использованием полученных значений пороговых циклов (C_t), включая оценку валидности контрольных образцов и ПЦР-исследования в целом. Полученные в ПО AmpliSens® HBV Soft результаты автоматически передаются в ПО ARTS для их визуализации оператору.

Допускается программирование и запуск детектирующего амплификатора без использования ПО AmpliSens® HBV Soft и ПО ARTS. В этом случае файл с данными, полученный на детектирующем амплификаторе, можно экспортировать в ПО AmpliSens® HBV Soft для дальнейшей автоматической интерпретации результатов.

Технологии искусственного интеллекта в ПО AmpliSens® HBV Soft не используются.

УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ

Требования к техническим средствам оператора

Персональный компьютер с предустановленным ПО ARTS. Системные требования к персональному компьютеру указаны в руководстве оператора ПО ARTS.

Для установки ПО ARTS необходимо обратиться в техническую поддержку для загрузки и запуска установочных файлов ПО ARTS (контакты технической поддержки см. в разделе «Техническая поддержка и информация о разработчике»).

Требования к входным данным

Обозначения ячеек исследуемых и контрольных образцов в интерфейсе ПО ARTS должны строго соответствовать их фактическому расположению в реакционном блоке детектирующего амплификатора.

Требования к информационной безопасности

Влияние угроз и уязвимостей ПО на пользователей или пациентов отсутствует.

ПО не содержит и не обрабатывает персональные данные пациентов.

Средства криптографической защиты в ПО не используются.

Доступ к ПО осуществляется с помощью авторизации пользователя в ПО ARTS (учетная запись). Уровень доступа пользователей должен быть обеспечен исходя из требуемого функционала.

В рамках инфраструктуры информационных технологий, использующей ПО, необходимо:

- предпринять меры обеспечения информационной безопасности и кибербезопасности для непрерывного функционирования программного обеспечения и исключения возможности несанкционированного доступа к информации в программном обеспечении;
- обеспечить наличие регулярных архивных копий ПО (в т.ч. базы данных) с возможностью их восстановления;
- использовать средства защиты от вредоносных программ;
- соблюдать требования к информационной безопасности, указанные в руководстве оператора ПО ARTS.

ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ

Загрузка ПО AmpliSens® HBV Soft в ПО ARTS

Загрузка ПО AmpliSens® HBV Soft в ПО ARTS при наличии подключения персонального компьютера к сети Интернет производится автоматически при запуске ПО ARTS.

При отсутствии подключения персонального компьютера к сети Интернет загрузка в ПО ARTS производится вручную с электронного носителя путем выбора файла с пакетом ПО, включающим ПО AmpliSens® HBV Soft. Для этого в меню *Постановки* выбрать *Пакеты ПО – Загрузить пакет*.

После завершения загрузки установленное ПО отображается в списке **Пакеты ПО** и доступно для формирования и расчета постановок.

Версия ПО AmpliSens® HBV Soft отображается в меню **Каталог методик** в столбце **Версия**, а также в меню **Постановки - Пакеты ПО**, после выбора пакета (версия ПО отображается с указанием номеров минорных и незначимых изменений).

Формирование и запуск постановки

Формирование постановки производится с использованием интерфейса ПО ARTS. В соответствии с руководством оператора к ПО ARTS необходимо выполнить следующие действия:

1. Открыть ПО ARTS.
2. Зарегистрировать серию набора реагентов и ввести переменную информацию (при наличии), используя информацию из вкладыша к данной серии набора реагентов.
3. При необходимости сформировать список образцов для исследования с применением набора реагентов (вручную или загрузить из лабораторных информационных систем).
4. Выбрать детектирующий амплификатор и необходимый реакционный блок.
5. Сформировать постановку. Для этого во вкладке, соответствующей выбранному прибору, выбрать **Постановка - Новая постановка**:
 - 5.1. Выбрать из списка доступных программных обеспечений ПО AmpliSens® HBV Soft и серию набора реагентов.
 - 5.2. На схематическом изображении реакционного блока детектирующего амплификатора в используемых ячейках разместить образцы из списка, сформированного в п.3, (или ввести их обозначения вручную) и контрольные образцы.
 - 5.3. Сохранить постановку нажатием кнопки **Сохранить**.
6. Для автоматического запуска амплификации нажать кнопку **Старт**. Ход амплификации отобразится в виде кривых накопления флуоресценции.

Примечание – Допускается программирование и запуск детектирующего амплификатора вручную в соответствии с программой амплификации, указанной в инструкции к набору реагентов.

Анализ и интерпретация результатов

После завершения амплификации ПО ARTS автоматически визуализирует кривые флуоресценции.

Примечание – Если детектирующий амплификатор был запрограммирован и

запущен вручную, необходимо сформировать постановку, как описано в разделе «Формирование и запуск постановки», нажать кнопку **Выбрать файл** для указания пути к файлу с детектирующего амплификатора и нажать **Рассчитать**.

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции в ПО ARTS указано в таблице 1.

Таблица 1

Флуорофор	FAM	JOE
Название канала детекции в ПО ARTS	FAM	HEX

В соответствии с критериями анализа кривых флуоресценции, указанными в ПО AmpliSens® HBV Soft, автоматически определяется статус каждой кривой по каждому каналу детекции: положительный, отрицательный или сомнительный.

Статус присваивается кривой на основании критериев, оценивающих отклонения от нормальной (S-образной) формы кривой накопления флуоресценции, например:

- наличие неспецифических скачков флуоресцентного сигнала;
- низкое соотношение сигнал/шум;
- кинетика накопления флуоресцентного сигнала, отличная от S-образной.

Сомнительные кривые классифицируются на «Сомнительно +» и «Сомнительно -», что следует интерпретировать как:

«Сомнительно +» – наиболее вероятно, что для кривой получен положительный результат, требуется подтверждение.

«Сомнительно -» – наиболее вероятно, что для кривой получен отрицательный результат, требуется подтверждение.

Каждой сомнительной кривой необходимо присвоить статус: «Положительный», «Отрицательный» или сделать заключение о необходимости повторного исследования данного образца. Для этого:

1. Отобразить кривые по всем каналам детекции в режиме отображения «сырых» данных с прибора (режим «RAW»).

ВНИМАНИЕ! Не следует принимать решение о статусе сомнительной кривой на основании просмотра нормализованных кривых (режим «Norma»), т.к. в данном режиме отображаются флуоресцентные кривые после математической обработки.

2. Отфильтровать кривые со статусом «Сомнительный» по каждому каналу. В скобках рядом с названием канала указано количество сомнительных кривых.
3. В списке образцов последовательно присвоить кривым статус «Положительный», «Отрицательный» или сделать заключение о необходимости повторного исследования данного образца («Перестановка» – образцы будут возвращены в список образцов для возможности повторного исследования).

ВНИМАНИЕ! Присвоение статуса сомнительным кривым производится на основании экспертного мнения сотрудника лаборатории, осуществляющего анализ результатов. В случае если для сомнительной флуоресцентной кривой не удастся принять однозначного решения по ее статусу, рекомендуется провести повторное исследование для данного образца.

После просмотра кривых флуоресценции и присвоения статуса всем сомнительным флуоресцентным кривым необходимо нажать кнопку **Результат** для интерпретации результатов.

Во вкладке **AmpliSens HBV Soft** будут выведены результаты, автоматически полученные ПО AmpliSens® HBV Soft на основании значений порогового цикла (Ct) для исследуемых образцов, включая оценку валидности контрольных образцов и ПЦР-исследования в целом.

Результаты для контрольных образцов выводятся в виде таблицы с детализацией по каналам детекции. Если для одного или нескольких контрольных образцов получено сообщение об ошибке, данный результат дублируется в строке статуса постановки.

Результаты для исследуемых образцов выводятся в качественном формате в виде таблицы с учетом статуса контролей и указанием канала детекции.

Возможные варианты интерпретации результатов исследуемых образцов указаны в таблице 2.

Таблица 2

Качественное определение	
Обнаружено	
Не обнаружено	
Невалидный (ВКО)	

Возможные варианты результатов для контролей и интерпретации результатов для исследуемых образцов с учетом статуса контролей указаны в таблице 3.

Таблица 3

Статус контроля	Интерпретация результатов для исследуемых образцов с учетом статуса контроля
	В соответствии с таблицей 2
Ошибка ПК	Интерпретация невозможна для образцов, в которых не обнаружен определяемый аналит
Ошибка ПК (по каналу ВКО)	Интерпретация невозможна для всех исследуемых образцов
Контаминация ОКО	Интерпретация невозможна для образцов, в которых обнаружен определяемый аналит
Ошибка ОКО	Интерпретация невозможна для всех исследуемых образцов
Ошибка К+	Интерпретация невозможна для образцов, в которых не обнаружен определяемый аналит
Ошибка К+ (по каналу ВКО)	В соответствии с таблицей 2

Статус контроля	Интерпретация результатов для исследуемых образцов с учетом статуса контроля
Контаминация К-	Интерпретация невозможна для образцов, в которых обнаружен определяемый аналит
Контаминация К- (по каналу ВКО)	В соответствии с таблицей 2

В случаях, перечисленных в таблице 2, для соответствующих исследуемых образцов в таблице результатов выводится сообщение «Интерпретация невозможна» с указанием причины (например, «Интерпретация невозможна (Ошибка ПК)»).

Авторизация результатов ПЦР-исследования

После вывода результатов для исследуемых образцов во вкладке **AmpliSens HBV Soft** необходимо авторизовать (подтвердить) или отвергнуть (отклонить) результаты автоматической интерпретации. Возможны следующие действия в соответствии с руководством оператора к ПО ARTS:

1. Отправка образца на повторное ПЦР-исследование.
2. Отмена результата ПЦР-исследования всех образцов в постановке.
3. Авторизация результата ПЦР-исследования каждого образца.
4. Авторизация результата ПЦР-исследования всех образцов в постановке.
5. Выгрузка результатов ПЦР-исследования в виде файла в формате CSV (в формате электронной таблицы).
6. Выгрузка постановки в отдельный файл для просмотра в ПО ARTS.
7. Закрытие вкладки с результатами ПЦР-исследования. Вкладка **AmpliSens HBV Soft** будет закрыта, результаты ПЦР-исследования будут сохранены. Для возвращения к результатам ПЦР-исследования необходимо во вкладке **Список постановок** выбрать из списка необходимую постановку и открыть ее двойным щелчком левой кнопки мыши.

Формирование бланка с результатами

ВНИМАНИЕ! Только авторизованные результаты ПЦР-исследования, полученные с помощью ПО **AmpliSens® HBV Soft**, передаются в ПО ARTS для формирования бланков с результатами для исследуемых образцов и/или передачи в лабораторную информационную систему.

Формирование бланков с результатами производится оператором в ПО ARTS. Поиск, просмотр и печать бланков осуществляется через интерфейс ПО ARTS в соответствии с руководством оператора ПО ARTS.

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ

Сообщение	Причина сообщения	Дальнейшие действия оператора
Для AmpliSens® HBV Soft не размещен контроль ПК	В реакционном блоке не размещен ПК	Указать положение ПК в реакционном блоке, используя кнопку ПК
Для AmpliSens® HBV Soft не размещен контроль K+	В реакционном блоке не размещен K+	Указать положение K+ в реакционном блоке, используя кнопку K+
Для AmpliSens® HBV Soft не размещен контроль ОК	В реакционном блоке не размещен ОК	Указать положение ОК в реакционном блоке, используя кнопку ОК
Ошибка ПК	Значение Ct для ПК отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора JOE	Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружена ДНК HBV. Необходимо повторить ПЦР-исследование для таких образцов начиная с этапа экстракции ДНК. Рекомендуется просмотреть положительные кривые флуоресценции в режиме отображения «сырых» данных с прибора (режим «RAW») на наличие участка характерного экспоненциального подъема. Если для исследуемого образца определено значение Ct, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема, требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца
Ошибка ПК (по каналу ВКО)	Значение Ct для ПК отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора FAM	Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК
Ошибка K+	Значение Ct для K+ отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора JOE	Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружена ДНК HBV. Необходимо повторить амплификацию для таких образцов. Рекомендуется просмотреть положительные кривые флуоресценции в режиме отображения «сырых» данных с прибора (режим «RAW») на наличие участка характерного экспоненциального подъема. Если для исследуемого образца определено значение Ct, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема, требуется повторно провести

Сообщение	Причина сообщения	Дальнейшие действия оператора
		амплификацию и детекцию для этого образца
Ошибка K+ (по каналу ВКО)	Значение C_t для K+ отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора FAM	Интерпретация результатов для исследуемых образцов проводится согласно таблице 2
Контаминация ОКО	Определено значение C_t для ОК по каналу для флуорофора JOE	Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена ДНК HBV. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для таких образцов, начиная с этапа экстракции ДНК
Контаминация K-	Определено значение C_t для K- по каналу для флуорофора JOE	Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена ДНК HBV. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию для таких образцов
Контаминация K- (по каналу ВКО)	Определено значение C_t для K- по каналу для флуорофора FAM	Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации. Интерпретация результатов для исследуемых образцов проводить согласно таблице 2
Ошибка ОКО	Значение C_t для ОК отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора FAM	Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА И ИНФОРМАЦИЯ О РАЗРАБОТЧИКЕ

При выявлении сбоев в работе ПО AmpliSens® HBV Soft рекомендуется обращаться в техническую поддержку. При обращении в техническую поддержку необходимо предоставить следующую информацию:

- Номер версии ПО AmpliSens® HBV Soft и ПО ARTS.
- Описание ошибки (текст или изображение).
- Описание действия / последовательности действий, при которых возникла ошибка.
- Контакты для обратной связи.

Сотрудники технической поддержки могут запросить дополнительную информацию для решения вопроса.

Телефон: +7(495) 304 22 06 в рабочие часы организации.

Почта: lab@amplisens.ru в режиме 24x7.

Разработчик ПО: Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Руководство оператора и интерфейс программного обеспечения разработаны на русском языке и могут быть переведены на другие языки без внесения изменений в программный код ПО.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 12
решидчать лист св

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



« 23 » 04 20 24 г.
М.П.

А.О.Лисицына



Инструкция по применению набора
реагентов расположена на сайте
www.amplisens.ru



Краткое руководство

набор реагентов «АмплиСенс® HBV-FL»

Форма 4

REF R-V5-Mod(RG,IQ,Mx,Dt)



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642,
e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

- «РИБО-сорб»;
- «РИБО-преп»;
- «МАГНО-сорб».

Контроли: внутренний контрольный образец (ВКО) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 положительный (ПК) и 1 отрицательный (ОК) контроли экстракции.

ОБЪЕМЫ ИССЛЕДУЕМОГО ОБРАЗЦА, КОНТРОЛЕЙ, ЭЛЮЦИИ ПРИ ЭКСТРАКЦИИ «РИБО-преп», «МАГНО-сорб»

При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:

ВКО STI-87	10 мкл	в каждый образец
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
ОКО + ПКО-1-HBV	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для ПК

Элюция

все образцы	50 мкл	в каждую пробирку
-------------	--------	-------------------

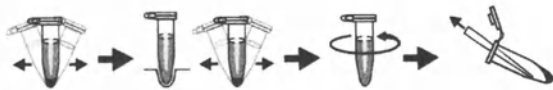
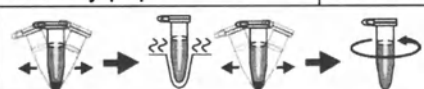
При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» добавить:

ВКО STI-87	10 мкл	в каждый образец
Исследуемые образцы	200 или 1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
ОКО + ПКО-1-HBV	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для ПК

Элюция

все образцы	50 мкл	в каждую пробирку
-------------	--------	-------------------

ЭКСТРАКЦИЯ С ПОМОЩЬЮ «РИБО-сорб»

Образец/реагент	Объем	Действие
ВКО STI-87	10 мкл	добавить в каждую пробирку
Лизирующий раствор	450 мкл	добавить в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	добавить в пробирки для исследуемых образцов
ОКО + ПКО-1-НВУ	90 мкл + 10 мкл	добавить в пробирку для ПК
ОКО	100 мкл	добавить в пробирку для ОК
Все пробирки с исследуемыми и контрольными образцами:		
		- закрыть крышки, перемешать на вортексе, осадить капли; - поместить в термостат на 10 мин при 60 °С; - осадить капли
Сорбент	25 мкл	ресуспендировать, добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, перемешать на вортексе; - оставить на 10 мин при комнатной температуре, тщательно перемешивая каждые 2 мин; - центрифугировать 1 мин при 7 тыс g; - удалить надосадочную жидкость
Раствор для отмывки 1	400 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе; - центрифугировать 1 мин при 7 тыс g; - удалить надосадочную жидкость
Раствор для отмывки 3	500 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе; - центрифугировать 1 мин при 7 тыс g; - удалить надосадочную жидкость
Раствор для отмывки 3	500 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе; - центрифугировать 1 мин при 7 тыс g; - удалить надосадочную жидкость
Раствор для отмывки 4	400 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе; - центрифугировать 1 мин при 7 тыс g; - удалить надосадочную жидкость; - открыть крышки, подсушить осадок 12-15 мин при 60 °С
РНК-буфер	50 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе; - прогреть 2-3 мин при 60 °С, перемешать на вортексе; - центрифугировать 1 мин при 12-13 тыс g
Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК		

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенной ДНК для проведения ПЦР проводить осторожно, не захватывая сорбент. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге при 12-13 тыс g в течение 1 мин.

ПОСТАНОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Пробы: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный контроль ПЦР (К+), 1 отрицательный (ПК), 1 отрицательный (ОК) контроли экстракции.

Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.

Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-1-FL HBV.

В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-1-FL HBV	$10 \times (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-В	$5 \times (N+K+1)$	
Полимераза (TaqF)	$0,5 \times (N+K+1)$	

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

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ПЦР исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 15 мкл		
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку	
Внести по 10 мкл		
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов	<i>При проведении экстракции с помощью сорбционных методов избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы ДНК, экстрагированной из ПК	в пробирку для ПК	
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	в пробирку для ОК	
KB2 HBV	в пробирку для K+	

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (K-). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл буфера для элюции.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

Запустить программу амплификации:

- либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® HBV Soft, детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS);
- либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения программы, указанной ниже, настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

Цикл	Программа амплификации для приборов роторного типа				Программа амплификации для приборов планшетного типа			
	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5	95	5 с	–	5
	60	20 с	–		60	20 с	–	
	72	15 с	–		72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow		60	30 с	FAM, JOE/HEX	
	72	15 с	–		72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! В случае если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК HBV, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 мин) для экономии времени.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам с помощью алгоритма, приведенного в инструкции, или с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® HBV Soft:

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Мишень для амплификации	ДНК ВКО	ДНК HBV

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов, граничные значения порогового цикла (Ct), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов вручную.

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2
два лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)

А.О.Лисицына А.О.Лисицына

2024 г.



ВКЛАДЫШ
к набору реагентов «АмплиСенс® HBV-FL»

Форма 4 **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt)

LOT 02.02.23

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000, Rotor-Gene Q

Примечание – Задать **Reaction volume/Объем реакции** – 25 мкл. Установить галочку **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска**, если такая опция предусмотрена в ПО прибора.

Канал	Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.	Threshold/Порог	Dynamic tube/Динамич.фон	Slope Correct/Коррект. уклона	More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов
FAM/Green	от 5FI до 10FI	0,03	включена	включена	10%
JOE/Yellow	от 5FI до 10FI	0,03	включена	включена	10%

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96

Примечание – Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec**

Канал	Threshold/Порог
FAM, JOE/HEX	Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию

«ДТ-96»/«ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Каналы	Критерий положительного результата ПЦР	Нижняя граница/Порог положительного результата	Верхняя граница/Порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
Ct (Cp) для всех каналов	Пороговый Ct	Fam, Hex	70 %	Не используется	Не используется	Не используется	Не используется

При использовании программного обеспечения прибора

Граничные значения порогового цикла Ct

Образец	Прибор роторного типа		Прибор планшетного типа	
	Канал для флуорофора			
	FAM	JOE	FAM	JOE
ВКО, ОК	25	Ct отсутствует	29	Ct отсутствует
ПК	25	28	29	32
К+	30	30	34	34
К–	Ct отсутствует		Ct отсутствует	
Исследуемые образцы	25	35	29	35

Продолжение см. на обороте

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов «АмплиСенс® HBV-FL»

Форма 4 **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt)

LOT 02.02.23

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000, Rotor-Gene Q

Примечание – Задать **Reaction volume/Объем реакции** – 25 мкл. Установить галочку **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска**, если такая опция предусмотрена в ПО прибора.

Канал	Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.	Threshold/Порог	Dynamic tube/Динамич.фон	Slope Correct/Коррект. уклона	More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов
FAM/Green	от 5FI до 10FI	0,03	включена	включена	10%
JOE/Yellow	от 5FI до 10FI	0,03	включена	включена	10%

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96

Примечание – Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec**

Канал	Threshold/Порог
FAM, JOE/HEX	Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию

«ДТ-96»/«ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Каналы	Критерий положительного результата ПЦР	Нижняя граница/Порог положительного результата	Верхняя граница/Порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
Ct (Cp) для всех каналов	Пороговый Ct	Fam, Hex	70 %	Не используется	Не используется	Не используется	Не используется

При использовании программного обеспечения прибора

Граничные значения порогового цикла Ct

Образец	Прибор роторного типа		Прибор планшетного типа	
	Канал для флуорофора			
	FAM	JOE	FAM	JOE
ВКО, ОК	25	Ct отсутствует	29	Ct отсутствует
ПК	25	28	29	32
К+	30	30	34	34
К–	Ct отсутствует		Ct отсутствует	
Исследуемые образцы	25	35	29	35

Продолжение см. на обороте

При использовании ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® HBV Soft

Граничные значения порогового цикла Ct

Образец	Прибор роторного типа		Прибор планшетного типа			
			CFX96		«ДТ-96»/«ДТпрайм»	
	Канал для флуорофора					
	FAM	JOE	FAM	JOE	FAM	JOE
ВКО, ОК	27	Ct отсутствует	29	Ct отсутствует	30	Ct отсутствует
ПК	27	32	29	32	30	33
К+	34	34	34	34	35	35
К-	Ct отсутствует		Ct отсутствует		Ct отсутствует	
Исследуемые образцы	27	38	29	35	30	37

При использовании ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® HBV Soft

Граничные значения порогового цикла Ct

Образец	Прибор роторного типа		Прибор планшетного типа			
			CFX96		«ДТ-96»/«ДТпрайм»	
	Канал для флуорофора					
	FAM	JOE	FAM	JOE	FAM	JOE
ВКО, ОК	27	Ct отсутствует	29	Ct отсутствует	30	Ct отсутствует
ПК	27	32	29	32	30	33
К+	34	34	34	34	35	35
К-	Ct отсутствует		Ct отсутствует		Ct отсутствует	
Исследуемые образцы	27	38	29	35	30	37

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ

к набору реагентов АмплиСенс® HBV-FL

Формат FRT Форма 4



R-V5-Mod(RG,IQ,Mx,Dt)

LOT



02.02.23

2024-02-02

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов
автоматизированным способом

ПО AmpliSens® HBV SoR v. 1.8.2

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ

к набору реагентов АмплиСенс® HBV-FL

Формат FRT Форма 4



R-V5-Mod(RG,IQ,Mx,Dt)

LOT



02.02.23

2024-02-02

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов
автоматизированным способом

ПО AmpliSens® HBV SoR v. 1.8.2

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ

к набору реагентов АмплиСенс® HBV-FL

Формат FRT Форма 4



R-V5-Mod(RG,IQ,Mx,Dt)

LOT



02.02.23

2024-02-02

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов
автоматизированным способом

ПО AmpliSens® HBV SoR v. 1.8.2

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ

к набору реагентов АмплиСенс® HBV-FL

Формат FRT Форма 4



R-V5-Mod(RG,IQ,Mx,Dt)

LOT



02.02.23

2024-02-02

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов
автоматизированным способом

ПО AmpliSens® HBV SoR v. 1.8.2

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



ВКЛАДЫШ

к набору реагентов «АмплиСенс® HBV-FL»

 Форма 4 **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt)

LOT A02.02.23

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000, Rotor-Gene Q

 Примечание – Задать *Reaction volume/Объем реакции* – 25 мкл. Установить галочку *15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска*, если такая опция предусмотрена в ПО прибора.

Канал	Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.	Threshold/Порог	Dynamic tube/Динамич.фон	Slope Correct/Коррект. уклона	More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов
FAM/Green	от 5FI до 10FI	0,03	включена	включена	10%
JOE/Yellow	от 5FI до 10FI	0,03	включена	включена	10%

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96

 Примечание – Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку *Step Options*, задать скорость нагревания/охлаждения *Ramp Rate 2,5 °C/sec*

Канал	Threshold/Порог
FAM, JOE/HEX	Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию

«ДТ-96»/«ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Каналы	Критерий положительного результата ПЦР	Нижняя граница/Порог положительного результата	Верхняя граница/Порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
Ct (Cp) для всех каналов	Пороговый Ct	Fam, Hex	70 %	Не используется	Не используется	Не используется	Не используется

При использовании программного обеспечения прибора

Граничные значения порогового цикла Ct

Образец	Прибор роторного типа		Прибор планшетного типа	
	Канал для флуорофора			
	FAM	JOE	FAM	JOE
ВКО, ОК	25	Ct отсутствует	29	Ct отсутствует
ПК	25	28	29	32
К+	30	30	34	34
К-	Ct отсутствует		Ct отсутствует	
Исследуемые образцы	25	35	29	35

Продолжение см. на обороте

ВКЛАДЫШ

к набору реагентов «АмплиСенс® HBV-FL»

 Форма 4 **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt)

LOT A02.02.23

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000, Rotor-Gene Q

 Примечание – Задать *Reaction volume/Объем реакции* – 25 мкл. Установить галочку *15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска*, если такая опция предусмотрена в ПО прибора.

Канал	Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.	Threshold/Порог	Dynamic tube/Динамич.фон	Slope Correct/Коррект. уклона	More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов
FAM/Green	от 5FI до 10FI	0,03	включена	включена	10%
JOE/Yellow	от 5FI до 10FI	0,03	включена	включена	10%

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96

 Примечание – Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку *Step Options*, задать скорость нагревания/охлаждения *Ramp Rate 2,5 °C/sec*

Канал	Threshold/Порог
FAM, JOE/HEX	Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию

«ДТ-96»/«ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Каналы	Критерий положительного результата ПЦР	Нижняя граница/Порог положительного результата	Верхняя граница/Порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
Ct (Cp) для всех каналов	Пороговый Ct	Fam, Hex	70 %	Не используется	Не используется	Не используется	Не используется

При использовании программного обеспечения прибора

Граничные значения порогового цикла Ct

Образец	Прибор роторного типа		Прибор планшетного типа	
	Канал для флуорофора			
	FAM	JOE	FAM	JOE
ВКО, ОК	25	Ct отсутствует	29	Ct отсутствует
ПК	25	28	29	32
К+	30	30	34	34
К-	Ct отсутствует		Ct отсутствует	
Исследуемые образцы	25	35	29	35

Продолжение см. на обороте

При использовании ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® HBV Soft

Граничные значения порогового цикла Ct

Образец	Прибор роторного типа		Прибор планшетного типа			
			CFX96		«ДТ-96»/«ДТпрайм»	
	Канал для флуорофора					
	FAM	JOE	FAM	JOE	FAM	JOE
ВКО, ОК	27	Ct отсутствует	29	Ct отсутствует	30	Ct отсутствует
ПК	27	32	29	32	30	33
К+	34	34	34	34	35	35
К-	Ct отсутствует		Ct отсутствует		Ct отсутствует	
Исследуемые образцы	27	38	29	35	30	37

При использовании ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® HBV Soft

Граничные значения порогового цикла Ct

Образец	Прибор роторного типа		Прибор планшетного типа			
			CFX96		«ДТ-96»/«ДТпрайм»	
	Канал для флуорофора					
	FAM	JOE	FAM	JOE	FAM	JOE
ВКО, ОК	27	Ct отсутствует	29	Ct отсутствует	30	Ct отсутствует
ПК	27	32	29	32	30	33
К+	34	34	34	34	35	35
К–	Ct отсутствует		Ct отсутствует		Ct отсутствует	
Исследуемые образцы	27	38	29	35	30	37

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов АмплиСенс® HBV-FL

Формат FRT Форма 4



R-V5-Mod(RG,IQ,Mx,D)

LOT



A02.02.23

2024-02-02

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов
автоматизированным способом

ПО AmpliSens® HBV Soft v. 1.0.2

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов АмплиСенс® HBV-FL

Формат FRT Форма 4



R-V5-Mod(RG,IQ,Mx,D)

LOT



A02.02.23

2024-02-02

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов
автоматизированным способом

ПО AmpliSens® HBV Soft v. 1.0.2

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов АмплиСенс® HBV-FL

Формат FRT Форма 4



R-V5-Mod(RG,IQ,Mx,D)

LOT



A02.02.23

2024-02-02

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов
автоматизированным способом

ПО AmpliSens® HBV Soft v. 1.0.2

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов АмплиСенс® HBV-FL

Формат FRT Форма 4



R-V5-Mod(RG,IQ,Mx,D)

LOT



A02.02.23

2024-02-02

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов
автоматизированным способом

ПО AmpliSens® HBV Soft v. 1.0.2

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 4
четыре лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



А.О.Лисицына

2024 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального бюджетного
учреждения науки «Центральный
научно-исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия
человека



В.Г. Акимкин

«01» сентября 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ стандартного образца предприятия № 51 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК вируса гепатита В» (СОП № 51 ПКО ДНК HBV)



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

1 ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ

1.1 Инструкция устанавливает порядок и условия применения стандартного образца предприятия № 51 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК вируса гепатита В» (СОП № 51 ПКО ДНК HBV), далее по тексту СОП, предназначенного для проведения испытаний методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) набора реагентов «АмплиСенс® HBV-FL».

1.2. Проверку упаковки, маркировки и целостности СОП № 51 ПКО ДНК HBV проводят путем внешнего осмотра.

2 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ. УДАЛЕНИЕ ОТХОДОВ

При работе с СОП и при постановке ПЦР следует соблюдать положения МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- 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.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку следует удалять 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».

3 МАТЕРИАЛЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И УСЛОВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА

3.1 Материалы и оборудование, необходимые для проведения ПЦР-анализа, согласно ТУ и/или инструкции к испытываемому набору реагентов.

3.2 Реагенты из испытываемого набора реагентов.

3.3 Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.

4 ПОДГОТОВКА К ПРИМЕНЕНИЮ

Перед началом работы достать из холодильника пробирку с СОП и дать нагреться до комнатной температуры. СОП должен представлять собой прозрачную или слегка мутную жидкость, не содержащую каких-либо включений или примесей. Допускается выпадение осадка бледного цвета. Оценить визуально.

5 ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

5.1 Содержимое пробирки с СОП перемешать и осадить капли на вортексе. Открыть пробирку и, используя наконечник с аэрозольным барьером, отобрать необходимый объем (см. следующий пункт), пробирку закрыть.

5.2 Приготовить разведения, указанные в ТУ / методике испытаний набора реагентов, с использованием негативной плазмы, приложенной к СОП.

Разведения готовить по следующей схеме:

- 1) исходный препарат, имеющий концентрацию $N \times 10^m$, развести N-кратно до ближайшего разведения 10^m с коэффициентом 1 (1×10^m).

Разведение провести согласно расчету, с использованием следующих формул:

$$N \times 10^m / 1 \times 10^m = N \quad (1)$$

$$C/N = A \quad (2)$$

$$C - A = B \quad (3), \text{ где}$$

$N \times 10^m$ – исходная концентрация СОП № 51 ПКО ДНК HBV,

1×10^m – ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 МЕ/мл.

N – во сколько раз необходимо развести исходный препарат, для того чтобы получить ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 (при необходимости полученное число округлить до целого),

A – объем исходного СОП, который необходимо взять для приготовления C мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл),

B – объем негативной плазмы, который необходимо взять для приготовления C мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл);

C – объем раствора, содержащий СОП в концентрации 1×10^m .

- 2) Полученный препарат СОП с концентрацией 1×10^m МЕ/мл развести последовательно десятикратно до получения первого разведения СОП с концентрацией, указанной в ТУ / методике испытаний набора реагентов;
- 3) Из полученного первого разведения СОП с коэффициентом 1, приготовить последующие разведения, указанные в ТУ/методике испытаний, путем последовательных двукратных, пятикратных и/или десятикратных разведений.

Например, СОП № 51 ПКО ДНК HBV имеет концентрацию $2,22 \times 10^9$ МЕ/мл. Необходимо подготовить разведение с концентрацией 5×10^4 МЕ/мл.

- маркируют пробирки вместимостью 1,5 мл « 1×10^9 », « 1×10^8 », « 1×10^7 », « 1×10^6 », « 1×10^5 » и « 5×10^4 »;

Разведение проводят согласно расчету, с использованием следующих формул:

$$2,22 \times 10^9 \text{ МЕ/мл} / 1 \times 10^9 \text{ МЕ/мл} = 2,22 \quad (1)$$

$$100 / 2,22 = 45 \text{ (мкл)} \quad (2)$$

$$100 - 45 = 55 \text{ (мкл)} \quad (3),$$

- в пробирку, маркированную « 1×10^9 » вносят автоматическим дозатором, используя отдельный наконечник с аэрозольным барьером, 55 мкл негативной плазмы и 45 мкл исходного СОП. Тщательно перемешивают и осаждают на вортексе;

- в пробирку, маркированную « 1×10^8 », вносят автоматическим дозатором, используя отдельный наконечник с аэрозольным барьером, 90 мкл негативной

плазмы и 10 мкл разведения СОП с концентрацией $1,0 \times 10^9$ МЕ/мл. Тщательно перемешивают и осаждают на вортексе;

- в пробирку, маркированную « 1×10^7 », вносят автоматическим дозатором, используя отдельный наконечник с аэрозольным барьером, 90 мкл негативной плазмы и 10 мкл разведения СОП с концентрацией $1,0 \times 10^8$ МЕ/мл. Тщательно перемешивают и осаждают на вортексе;

- аналогичным образом готовят разведения « 1×10^6 », « 1×10^5 »;

- для получения концентрации 5×10^4 МЕ/мл

$$1 \times 10^5 \text{ МЕ/мл} / 5 \times 10^4 \text{ МЕ/мл} = 2 \quad (1)$$

$$100 / 2 = 50 \text{ (мкл)} \quad (2)$$

$$100 - 55 = 50 \text{ (мкл)} \quad (3),$$

- в пробирку, маркированную « 5×10^4 » вносят автоматическим дозатором, используя отдельный наконечник с аэрозольным барьером, 50 мкл негативной плазмы и 50 мкл разведения СОП с концентрацией $1,0 \times 10^5$ МЕ/мл. Тщательно перемешивают и осаждают на вортексе.

Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию не менее 10^3 МЕ/мл, можно хранить при температуре не выше минус 68°C в течение срока годности. Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию менее 10^3 МЕ/мл, хранению не подлежат и готовятся заново из разведения СОП с концентрацией 10^3 МЕ/мл.

5.3 Далее провести анализ разведений СОП в соответствии с ТУ / методикой испытаний набора реагентов.

6 ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ

Реагент	Объем, мл	Количество
<u>СОП</u> № 51 ПКД ДНК НВУ	0,15	1 пробирка
Негативная плазма	1,5	1 пробирка

7 СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

В соответствии со свидетельством на СОП. Срок годности и условия хранения вскрытого СОП соответствует сроку годности и условиям хранения невскрытого стандартного образца предприятия.

8 АДРЕСА ДЛЯ СПРАВOK И РЕКЛАМАЦИЙ

Рекламации направлять в адрес производителя: 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, тел. (495) 974-96-42.

СВИДЕТЕЛЬСТВО

на стандартный образец предприятия № 51 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК вируса гепатита В»
(СОП № 51 ПКО ДНК HBV)

Реагент	Серия	Срок годности
СОП № 51 ПКО ДНК HBV	08.07.21/10.07.21/60	2024-07-08

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Стандартный образец предприятия № 51 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК вируса гепатита В» (СОП № 51 ПКО ДНК HBV), предназначен для проведения испытаний методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) набора реагентов «АмплиСенс® HBV-FL».

2 ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ

СОП № 51 ПКО ДНК HBV представляет собой инаktivированную плазму периферической крови человека, инфицированного вирусом гепатита В.

3 АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Концентрация ДНК вируса гепатита В $1,96 \times 10^6$ МЕ/мл (6,29 lg МЕ/мл, стандартное отклонение 0,07 lg МЕ/мл).

4 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Хранить при температуре не выше минус 68 °С в течение срока годности. Транспортировать при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С не более 5 суток.

5 РИСКИ И МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

СОП № 51 ПКО ДНК HBV не содержит запрещенных к пересылке наземным или авиатранспортом взрывоопасных, наркотических, психотропных, токсичных веществ и инфекционных агентов.

При работе следует соблюдать положения МУ 1.3.2569-09 [1] и меры безопасности, указанные в инструкции по применению данного стандартного образца предприятия.

6 ДОКУМЕНТ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ПОРЯДОК И УСЛОВИЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Инструкция по применению стандартного образца предприятия № 51 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК вируса гепатита В» (СОП № 51 ПКО ДНК HBV).

7 ПРОЦЕДУРА ПРИГОТОВЛЕНИЯ И КОНТРОЛЬ ПРОДУКТА

7.1 Для приготовления СОП № 51 ПКО ДНК HBV используют КПр ДНК HBV.

7.2 КПр ДНК HBV был получен путем инаktivации плазмы периферической крови человека, инфицированного вирусом гепатита В.

Наличие HBs-антигена и отсутствие антител к HCV, HIV, RPR в плазме было подтверждено с помощью иммуноферментных тест-систем. Наличие ДНК HBV и отсутствие РНК HCV, РНК HDV, РНК HIV в плазме было подтверждено с

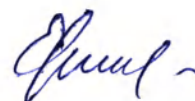
помощью наборов реагентов «АмплиСенс® HCV / HBV / HIV-FL», «АмплиСенс® HDV-FL», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

- 7.3 Полученный препарат плазмы периферической крови протестирован с помощью набора реагентов «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL».
- 7.4 Для приготовления СОП № 51 ПКО ДНК HBV КПр ДНК HBV разводят в плазме периферической крови человека, негативной на наличие вируса гепатита В (далее – «негативная плазма») до требуемой концентрации. Отсутствие HBs-антигена и антител к HCV, HIV, RPR в негативной плазме было подтверждено с помощью иммуноферментных тест-систем, отсутствие ДНК HBV, РНК HCV, РНК HDV, РНК HIV – с помощью наборов реагентов «АмплиСенс® HCV / HBV / HIV-FL», «АмплиСенс® HDV-FL», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
- 7.5 Приготовленный СОП № 51 ПКО ДНК HBV фасуют в соответствии с инструкцией по применению данного стандартного образца предприятия, и хранят в соответствии с настоящим свидетельством.
- 7.6 В соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 15194 [2] проводят аттестацию СОП № 51 ПКО ДНК HBV данной серии, по схеме, описанной в п. 5.5 ГОСТ ISO 17511-2011 [3]. См. приложение 1.

8 БИБЛИОГРАФИЯ

1. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».
2. ГОСТ Р ИСО 15194 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в биологических пробах. Требования к аттестованным стандартным образцам и содержанию сопроводительной документации».
3. ГОСТ ISO 17511-2011 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам».

Старший технолог УКП
НПЛ ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



С.Н. Ерюкова

« 01 » сентября 2023 г.

Отчет об измерении

Международно-признанный калибратор	WHO International Standard 4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT
Выбранная производителем методика выполнения измерения	Измерение концентрации относительно WHO International Standard 4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT в наборе реагентов «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL»
Тестируемый образец (рабочий калибратор производителя)	<u>СОП</u> № 51 ПКО ДНК HBV
Серия	08.07.21/10.07.21/60
Дата измерения	30.07.21
Среднее значение концентрации, МЕ/мл	$1,96 \times 10^6$
Среднее значение концентрации, Ig МЕ/мл	6,29
Стандартное отклонение (SD), Ig МЕ/мл	0,07

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



А.О.Лисицына
20 24 г.

М.П.