СОГЛАСОВАНО
Заместитель Министра здравоохранения
Республики Беларусь

_____ Б.Н. Андросюк
«____»_____ 2019 г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор Государственного учреждения
«Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

_____ В.А. Горбунов
«____»_____ 2019 г.

Набор реагентов для выявления генотипа и мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита В при исследовании методом секвенирования «Бел ВГВ генотип/резистентность»

Инструкция по применению

СОГЛАСОВАНО
Зам. директора
РУП «Центр экспертиз и
испытаний в здравоохранении»
_____ Д.В. Гринько
«_____»_____2019 г.

СОГЛАСОВАНО

_____
«_____»_____2019 г.

СОГЛАСОВАНО

_____
«_____» _____2019 г.

СОГЛАСОВАНО

_____
«_____»_____2019 г.

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВГВ	- вирус гепатита В
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
п.н.	- пар нуклеотидов
К+	- положительный контроль
К-	- отрицательный контроль

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ



- серия


- дата изготовления (год-месяц-день)


- срок годности (год-месяц-день)


- условия хранения


- производитель

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«Бел ВГВ генотип/резистентность»** предназначен для определения генотипа и мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита В методом полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием продуктов амплификации.

Набор рассчитан на исследование 24 образцов, включая положительный (К+) и отрицательный (К-) контрольные образцы.

ВНИМАНИЕ! Набор рекомендован для проведения исследования с использованием секвенаторов компании Applied Biosystems (США).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение генотипа и мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита В методом полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием продуктов амплификации набора реагентов **«Бел ВГВ генотип/резистентность»** включает в себя следующие этапы:

1. Постановка ПЦР;
2. Электрофоретическая детекция продуктов амплификации;
3. Очистка продуктов ПЦР;
4. Секвенирующая ПЦР;
5. Очистка преципитацией;
6. Секвенирование нуклеотидных последовательностей;
7. Биоинформационный анализ и интерпретация результатов.

Таблица 1 – Состав комплекта набора

№	Наименование компонента	Состав компонента	Объем, мл	Количество
1	«КОНТРОЛЬ»	Положительный контроль, $К^+$	0,01	1 пробирка
		Отрицательный контроль, К-	0,6	1 пробирка
2	«ПЦР»	ПЦР-смесь-1	0,83	1 пробирка
		ПЦР-смесь-2	0,83	1 пробирка
		Taq-ДНК-полимераза	0,016	1 пробирка
3	«ЭФ»	Агароза	1,7 грамм	1 пакет
		10х Трис-боратный буфер (10хТБЕ)	50	1 флакон
		Загрузочный буфер	0,036	1 пробирка
		Маркер молекулярного веса	0,025	1 пробирка
		Бромистый этидий (EtBr)	0,01	1 пробирка
4	«ОЧИСТКА ПЦР»	Чистящий реагент	0,05	1 пробирка
5	«СЕКВ»	Секвенс-Микс-№1	0,51	1 пробирка
		Секвенс-Микс-№2	0,51	1 пробирка
6	«ОЧИСТКА СЕКВ»	Формамид	1,1	1 пробирка
		Ацетат натрия	0,11	1 пробирка
		Этанол 96%	1,3	2 пробирки
		Этанол 70%	13	1 флакон

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 2. Проведение ПЦР и секвенирующей ПЦР

1. Одноразовые пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл;
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, 20, 100 и/или 200 мкл;
3. Дозаторы переменного объема;
4. Штативы для наконечников и пробирок объемом 0,2 мл;

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

5. ПЦР-бокс;
6. Программируемый амплификатор с активным терморегулированием для пробирок объемом 0,2 мл
7. Морозильная камера от -15 до -25°С.

ЗОНА 3. Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР-амплификации и секвенирование

1. Камера для горизонтального электрофореза объемом не более 0,5 л;
2. Источник постоянного тока с регулируемым напряжением в диапазоне 150-450 V;
3. Ультрафиолетовый трансиллюминатор;
4. Видеосистема регистрации гелей;
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10 и/или 20 мкл;
6. Дозаторы переменного объема;
7. Микроволновая печь для плавления агарозы;
8. Термостойкая колба объемом 200-250 мл;
9. Мерный цилиндр объемом 1 л;
10. Термическая рукавица.

ЗОНА 4. Очистка продуктов амплификации после ПЦР и секвенирующей ПЦР

1. Одноразовые пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл;
2. Одноразовые пробирки типа «Эппендорф» объемом 0,2 мл
3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром объемом 20, 100 (либо 200) мкл и 1 мл;
4. Дозаторы переменного объема;
5. ПЦР-бокс;
6. Программируемая центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с активным охлаждением до 4°С и максимальной скоростью центрифугирования не менее 12000 g;
7. Холодильник бытовой с морозильной камерой;
8. Микровстряхиватель для пробирок;
9. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» с диапазоном температур +25-95°С;
10. Программируемый амплификатор с активным терморегулированием для пробирок объемом 0,2 мл с возможностью работы с объемами менее 10 мкл.

ЧИСТАЯ ЗОНА. Биоинформационный анализ

1. Персональный компьютер с выходом в интернет с установленным программным обеспечением для анализа данных.

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

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Внимание! Отрицательный контрольный образец (К-) должен проходить этапы 1-5 включительно, вместе с исследуемыми образцами. Положительный контрольный образец (К+) используется в этапах 3-5 включительно.

Этап 1. Выделение ДНК ВГВ из биологического материала

Зона 1

Выделение ДНК ВГВ из биологического материала проводится в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для экстракции ДНК (любого производителя).

В дополнение к исследуемым образцам, необходимо использовать отрицательный контроль экстракции ДНК (К-) – буфер для элюции или дистиллированную воду.

В случаях, когда вирусная нагрузка в образцах не превышает 1000 копий ДНК/мл, необходимо предварительно центрифугировать образцы при следующих условиях:

время	60 минут
температура	4-8°С
g	21000g
объем	500 мкл

После центрифугирования необходимо отобрать надосадочную жидкость. Так как образующийся осадок невозможно визуализировать, отбирать надосадочную жидкость следует по противоположной от осадка стенке пробирки. Дальнейшие этапы выделения производятся в соответствии с инструкцией.

Этап 2. ПЦР

Зона 2 Набор реагентов – «ПЦР», «КОНТРОЛЬ»

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

Внимание! Во время работы все реактивы и кДНК должны храниться на льду (используйте хладоэлементы).

Первый раунд ПЦР

<table>
<tr><td>1</td><td>Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 0,2мл. Начиная с данного этапа, необходимо использовать положительный контроль (К+).</td></tr>
<tr><td>2</td><td>Подготовить исследуемые образцы ДНК ВГВ и контрольные образцы после выделения ДНК/после первого раунда ПЦР.
Если до проведения ПЦР образцы были заморожены, их следует разморозить, осадить в микроцентрифуге (30 сек, 11000 об/сек), затем поместить штатив с образцами на лед.</td></tr>
<tr><td>3</td><td>Разморозить необходимые реактивы: ПЦР-смесь-1 или ПЦР-смесь-2 в зависимости от раунда ПЦР</td></tr>
<tr><td>3</td><td>Приготовить ПЦР-мастер микс из расчета на n+1 образец. Для этого в отдельной пробирке объемом не менее 0,6 мл смешать:
<table>
<tr><th>Компонент</th><th>1 образец, мкл</th></tr>
<tr><td>ПЦР-смесь-1 или -2</td><td>22,8</td></tr>
<tr><td>ДНК-полимераза</td><td>0,2</td></tr>
</table>
Внимание! ДНК-полимеразу следует доставать из морозильной камеры непосредственно перед добавлением в ПЦР-смесь!
Внимание! Готовую ПЦР-смесь хранить не более 15мин.</td></tr>
<tr><td>4</td><td>Добавить в промаркированные пробирки объемом 0,2 мл по 23 мкл приготовленного ПЦР-мастер микса.</td></tr>
<tr><td>5</td><td>Добавить в каждую пробирку по 2 мкл соответствующей ДНК ВГВ.
Кратко осадить пробирки в течение 2-4 сек.</td></tr>
<tr><td>6</td><td>Поместить пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл.</td></tr>
</table>

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

<table>
<tr><td></td><td>
Программа амплификации:

95°C 2 мин
95°C 30сек
55°C 30сек 35 циклов
72°C 1мин
72°C 7мин
10°C хранение (не более 24 часов)
</td></tr>
<tr><td>7</td><td>Полученная ДНК готова к проведению электрофореза.
Хранить ДНК при температуре не выше -18°C не более 1 недели.</td></tr>
</table>

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

Этап 3. Электрофоретическая детекция продуктов амплификации

Зона 3. Набор реагентов – «ЭФ»

Перед работой **бромистый этидий (EtBr**) необходимо осадить кратковременным центрифугированием.

1. Приготовление рабочего раствор для электрофореза

1. В мерный цилиндр добавить 25 мл концентрированного (10Х) трис-боратного буфера (ТВЕ)
2. Довести объем дистиллированной водой до 500мл

2. Приготовление агарозного геля

1. В стеклянную колбу из термостойкого стекла пересыпать содержимое 1 пакета с агарозой.
2. Добавить 110 мл приготовленного рабочего раствора для электрофореза, перемешать вращением колбы, прикрыть крышкой (не герметично).
3. Плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы (довести до кипения: 800W, 90 секунд; извлечь колбу, перемешать смесь вращением колбы, снова довести до кипения: 800W, 90 секунд).

   ВНИМАНИЕ! При извлечении колбы из микроволновой печи использовать термическую рукавицу!

4. Извлечь колбу из микроволновой печи и остудить агарозу до 65-70°С.
5. Добавить в расплавленную агарозу 5 мкл бромистого этидия, перемешать, аккуратно вращая колбу.
6. Выровнять столик для заливки геля. Залить расплавленную агарозу на подложку, вставить гребенки, не касаясь дна формы, оставить до полного застывания геля (30 минут при комнатной температуре).После того как гель полностью застыл, аккуратно удалить гребенку и поместить гель в электрофоретическую камеру.
7. Добавить в электрофоретическую камеру достаточное количество рабочего раствора для электрофореза в прибор для электрофореза, чтобы гель был покрыт слоем буфера около 2 – 5мм.

3. Проведение электрофоретической детекции

1. Пробирки с продуктами амплификации последовательно выставить в штатив.
2. Используя для каждого образца новый наконечник, смешать 5 мкл исследуемого образца с 1 мкл загрузочного буфера и перенести всю 5 мкл смеси в лунку геля.
3. Повторить для всех исследуемых образцов, включая контроли.
4. Добавить в свободную лунку 5 мкл маркера молекулярного веса.
5. Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность, и включить его. Оптимальная напряженность электрического поля составляет 10 В/см при параметрах 240 W, 400 mA – 70,0 W, время электрофореза – 18 минут. Во время электрофореза молекулы ДНК разделяются согласно их молекулярной массе. Бромид этидия включается в ДНК и в УФ-свете полосы ДНК флюоресцируют. Молекулярная масса продуктов ПЦР определяется согласно молекулярной массе ДНК-маркера.
6. По завершении электрофореза выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор лунками вверх. Сфотографировать гель, обработать изображение, отметив порядок нанесения и занести в базу данных.

Для определения генотипа ВГВ и его резистентности к противовирусным препаратам методом секвенирования отбираются положительные образцы, имеющие размер ампликонов 860-880 п.н. Такие образцы переносятся в зону 4 для дальнейшей работы.

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

Этап 4. Чистка ПЦР-продукта

Зона 4

Набор реагентов – «ОЧИСТКА ПЦР»

1	Подготовить исследуемые образцы ДНК ВГВ Извлечь из морозильной камеры: • **чистящий реагент**
2	Добавить во все исследуемые образцы по **1,5** мкл **чистящего реагента**
3	Поместить пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси – 6,5 мкл. Программа чистки: 37°С 10 мин 80°С 10 мин 10°С хранение (не более 1 часа)
7	Очищенная ДНК готова к использованию в секвенирующей ПЦР. Хранить ДНК при температуре не выше -18°С не более 1 суток.

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

Этап 5. Секвенирующая ПЦР

Набор реагентов – «СЕКВ»

Перед постановкой секвенирующей ПЦР необходимо провести разведение ДНК в зависимости от интенсивности полосы на электрофорезе:

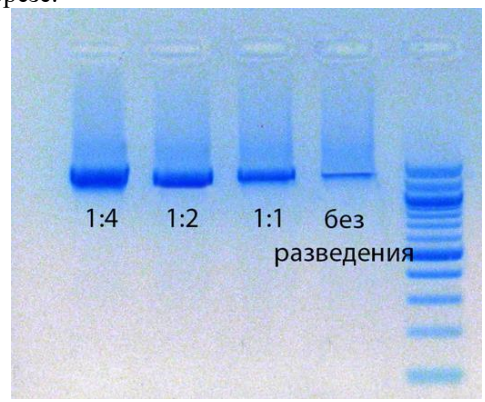


Рисунок 2 – Пример разведения ПЦР-продуктов, содержащих ДНК в разной концентрации

Проведение секвенирующей ПЦР

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

Внимание! Во время работы все реактивы и ДНК должны храниться на льду (используйте хладоэлементы).

1	Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл. Для каждого образца необходимо использовать 2 отдельные пробирки с каждым из двух Секвенс-Миксов. Подготовить исследуемые образцы ДНК Разморозить необходимые реактивы: **Секвенс-Микс-№1** **Секвенс-Микс-№2**
2	Рекомендуется следующая маркировка пробирок для одного исследуемого образца: **ID* №1** **ID* №2** *ID – имя или номер одного исследуемого образца №1, №2 – название используемого Секвенс-Микса
3	Добавить в каждую промаркированную пробирку по **9 мкл** соответствующего Секвенс-Микса.
4	Добавить по **1 мкл** разведенной ДНК исследуемого образца в соответствующие пробирки с **Секвенс-Миксами-№1 и -№2**. Кратко осадить пробирки в течение 2-4 сек.

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

5	Поместить пробирки в амплификатор. Установить объем смеси 10 мкл. Программа амплификации для секвенирующей ПЦР:

96°C	1мин	
96°C	10сек	
50°C	5сек	25 циклов
60°C	4мин	
4°C	хранение	не более 24 часов

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

Этап 6. Очистка ПЦР-продукта после секвенирующей ПЦР

Зона 4 Набор реагентов – «ОЧИСТКА СЕКВ»

Хранить при температуре -15-25ºС в морозильной камере.

Процедура очистки продуктов ПЦР:

1.	Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл
2.	Приготовить смесь холодного 96 % этанола и ацетата натрия из расчета на 1 образец: **этанол 96 % - 50 мкл (-15-25ºС)** **ацетат натрия - 2 мкл** **Внимание**! Готовить смесь необходимо из расчета на 2 образца больше.
3.	Добавить **52 мкл** смеси этанола и ацетата натрия в маркированные пробирки.
4.	Кратким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок с ПЦР продуктом после секвенирующей ПЦР.
5.	Перенести весь ПЦР-продукт (10 мкл) в пробирки со смесью этанола и ацетата натрия, перемешать на микровстряхивателе.
6.	Центрифугировать пробирки в центрифуге: **обороты в мин: > 12000 g** **время: 20 мин** **температура: 4ºС**
7.	По окончании центрифугирования аккуратно удалить надосадочную жидкость. **Внимание!** Осадок невидимый. **Внимание!** При удалении надосадочной жидкости следуйте наконечником за ее поверхностью по стенке пробирки, противоположной осадку.
8.	Добавить в пробирки по 250 мкл холодного 70 % этанола, перемешать на микровстряхивателе.
9.	Центрифугировать пробирки в центрифуге: **обороты в мин: > 12000 g** **время: 10 мин,** **температура: 18-25ºС**
10.	По окончании центрифугирования аккуратно удалить надосадочную жидкость. **Внимание!** Осадок невидимый. **Внимание!** При удалении надосадочной жидкости следуйте наконечником за ее поверхностью по стенке пробирки, противоположной осадку.
11.	Высушить осадок при 95ºС в течение 2 мин. Крышки пробирок должны быть открыты.
12.	Добавить в пробирки по 10 мкл формамида, перемешать на микровстряхивателе, кратким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.
13.	Прогреть пробирки при 95ºС в течение 2 мин.
14.	Пробы готовы для загрузки в генетический анализатор. Хранить образцы при температуре -15-25ºС не более недели.

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

Этап 7. Секвенирование

Для секвенирования нуклеотидных последовательностей исследуемых образцов необходимо использовать генетический анализатор (секвенатор) в соответствии с инструкцией к прибору. В процессе работы секвенатора проводится автоматическая детекция нуклеотидных последовательностей продуктов реакции секвенирования.

Этап 8. Биоинформационный анализ

Для получения нуклеотидной последовательности одного исследуемого образца необходимо собрать контиг из двух соответствующих электрофореграмм для каждого из образцов (форвард и реверс).
Анализ выполнен с использованием on-line программы
http://www.hiv-grade.de/hbv_grade/deployed/grade.pl?program=hbvalg.

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

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления. Датой изготовления считается дата приемки ОБК изготовителя. Набор 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.

ТРАНСПОРТИРОВКА

Компоненты набора необходимо транспортировать в соответствии с правилами хранения реагентов набора.

ХРАНЕНИЕ

ВНИМАНИЕ! Набор после получения необходимо разукомплектовать в соответствии с условиями хранения отдельных компонентов:

Наименование компонента	Условия хранения
«КОНТРОЛЬ»,«ПЦР», «ОЧИСТКА ПЦР», «СЕКВ», «ОЧИСТКА СЕКВ»	-15-25ºС
«ЭФ»	-15-25ºС, 2-8ºС, 18-25 ºС

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