Организация-производитель

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «НПО ДНК-Технология»

В.Ю. Дмитровский

«11» апреля 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

ВГБ-ГЕН

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «НПО ДНК-Технология»
ДМИТРОВСКИЙ В.Ю.
ПОДПИСЬ

2022 г.

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

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Настоящая инструкция распространяется на набор реагентов для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (ВГБ-ГЕН).

1.2 Набор реагентов ВГБ-ГЕН предназначен для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) методом полимеразной цепной реакции в образцах плазмы крови.

1.3 Набор может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике для диагностики вируса гепатита В *in vitro*.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Состав набора

Набор реагентов включает следующие комплекты:

a) Комплект для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК);

b) Комплект реагентов для ПЦР-амплификации, в форматах:

- с детекцией в режиме реального времени,
- с флуоресцентной детекцией по конечной точке,
- с детекцией методом гель-электрофореза.

c) Комплект реагентов для детекции ДНК методом гель-электрофореза.

Комплекты реагентов для ПЦР-амплификации различаются способом детекции амплифицированной ДНК вируса гепатита В:

- формат «с детекцией в режиме реального времени», маркируется «Real-time» – предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью амплификаторов детектирующих;

- формат «с флуоресцентной детекцией по конечной точке», маркируется – «Flash» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора;

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

- формат «с детекцией методом гель-электрофореза», маркируется «Eph» – предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

В состав набора реагентов ВГБ-ГЕН входят следующие компоненты:

а) Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК), включает:

- Лизирующий раствор – 1 флакон (30 мл);
- Промывочный раствор № 1 –1 флакон (50 мл);
- Промывочный раствор № 2 –1 флакон (30 мл);
- Реагент для преципитации – 1 флакон (40 мл);
- Буфер для растворения –4 пробирки (по 1,25 мл);
- Отрицательный контрольный образец – 2 пробирки (по 1,5 мл);
- Внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл);
- Внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл).

Примечание – Комплект является универсальным для всех форматов. Включается в набор по запросу.

b) Комплект реагентов для ПЦР-амплификации, включает:

- Смесь для амплификации, запечатанную парафином – не более 100 пробирок/ или 12 стрипов по 8 пробирок (по 20 мкл);
- ПЦР-буфер – 2 пробирки (по 500 мкл);
- Полимеразу ТехноТаq – 1 пробирка (50 мкл);
- Минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- Положительный контрольный образец – 1 пробирка (150 мкл).

Принадлежности: Крышки для стрипов – 12 шт.

Примечание – принадлежности входят в состав набора реагентов при расфасовке в стрипы.

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

с) Комплект реагентов для детекции ДНК методом гель-электрофореза включает:

- Смесь для электрофореза – 1 пакет (9,55 г);
- Агарозный гель – 5 пластин.

Примечание – Комплект используется в наборе формата «с детекцией методом электрофореза». Включается в набор по запросу заказчика.

2.2 Число анализируемых проб

Набор рассчитан на проведение 96 определений для формата «с детекцией в режиме реального времени» и 100 определений для форматов «с флуоресцентной детекцией по конечной точке» и «методом гель-электрофореза», включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймера с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в амплификационную смесь происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В наборах в формате «с детекцией в режиме реального времени» и «с флуоресцентной детекцией по конечной точке» в реакционную смесь введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается,

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

действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

Исследование с использованием набора реагентов ВГБ-ГЕН состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификации ДНК (HBV), детекция продуктов амплификации. Внутренний контрольный образец, добавляется в исследуемый образец на стадии выделения нуклеиновых кислот и предназначен для оценки качества всех этапов исследования.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации искомой ДНК, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации внутреннего контрольного образца (ДНК-ВК), входит флуоресцентный краситель Hex.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку позволяет одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Для анализа продуктов ПЦР можно также использовать метод электрофореза в агарозном геле.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
HBV	ДНК-ВК	-	-	-

2.4 Время проведения анализа - от четырех часов, включая пробоподготовку.

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность анализа

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК вируса гепатита В, ПЦР-детектор (формат «с флуоресцентной детекцией по конечной точке») или детектирующий амплификатор (формат «с детекцией в режиме реального времени») должны регистрировать положительный результат наличия специфического продукта HBV. При использовании метода гель-электрофореза (формат «с детекцией методом гель-электрофореза»), должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома вируса гепатита В (HBV) размером 295 п.н. (пар нуклеотидов).

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК вируса гепатита В, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должны регистрировать отрицательный результат наличия специфического продукта HBV и положительный результат наличия внутреннего контрольного образца. При использовании метода гель-электрофореза полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома вируса гепатита В размером 295 п.н. отсутствует, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., должна быть отчетливо видна.

3.2 Аналитическая чувствительность анализа: 200 копий на 1 мл плазмы.

3.3 Диагностическая чувствительность: 99,8%

3.4 Диагностическая специфичность: 100 %.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические ПЦР исследования клинического материала с соблюдением методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», и с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 3.3686-2021 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

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

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

Выделение ДНК следует проводить в ламинарных шкафах с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов следует проводить в ПЦР-боксах.

При работе с комплектами реагентов в форматах «с детекцией в режиме реального времени» и с «флуоресцентной детекцией по конечной точке» при удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) запрещается открытие пробирок, так как это может привести к разбрызгиванию содержимого и контаминации продуктами ПЦР оборудования, реагентов и лабораторной зоны.

Лабораторное оборудование и принадлежности, используемые при работе с набором, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-2021. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.

Промывочный раствор № 1, входящий в состав комплекта реагентов ПРОБА-НК, содержит раствор изопропанола[1] (указание на риски: H225, H319, H336).

Промывочный раствор № 2, входящий в состав комплекта реагентов ПРОБА-НК, содержит метилацетат[1] (указание на риски: H225, H319, H336).

[1] H225 – Легковоспламеняющиеся жидкость и пары; H319 – вызывает раздражение глаз; H336 – Может вызывать сонливость и головокружение.

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

Отрицательный контрольный образец, входящий в состав комплекта реагентов ПРОБА-НК, содержит азид натрия (консервант) в концентрации меньше (<) 0,06 %, что является безопасным для конечного пользователя.

При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдению мер предосторожности, контакт с организмом человека исключен.

Не использовать комплект реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов указанному в паспорте к комплекту;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов комплекта;
- по истечению срока годности комплекта.

Примечание – Комплект реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

Утилизировать неиспользованные реактивы, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты и биологический материал необходимо в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-2021 «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».

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3. 2569-09.

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

При работе с набором реагентов ВГБ-ГЕН требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	с детекцией в режиме реального времени	с флуоресцентной детекцией по конечной точке	с детекцией методом гель-электрофореза
ПЦР-бокс	да	да	да
амплификатор детектирующий: ДТпрайм, ДТлайт, ДТ-96, iCycler iQ, iCycler iQ5, Rotor-Gene Q	да	нет	нет
детектор полимеразной цепной реакции флуоресцентный «ДЖИН-4» или аналогичный	нет	да	нет
термостат программируемый для ПЦР-анализа «Терцик» или аналогичный	нет	да	да
термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1-«ДНК-Техн.» или аналогичный	да	да	да
устройство для электрофореза нуклеиновых кислот в агарозных и акриламидных гелях УЭФ-01-«ДНК-Тех.» или аналогичное	нет	нет	да
трансиллюминатор ультрафиолетовый (флуоскоп)	нет	нет	да
миткроцентрифуга-вортекс	да	да	да
центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF не ниже 17000 g	да	да	да
холодильник бытовой с морозильной камерой	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок	да	да	да
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 0,5-10 мкл, 2,0-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл	да	да	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНК-аз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;	да	да	да
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками	да	да	да
колба мерная, вместимостью 1000 мл	нет	нет	да
вода дистиллированная	да	да	да
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да
маркер длин амплифицированных фрагментов (pUC19 ДНК/MspI)	нет	нет	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;	да	да	да
дезинфицирующее средство	да	да	да

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

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используют цельную периферическую кровь человека.

6.1 Взятие образцов периферической крови

Взятие цельной периферической крови проводится в вакумные пластиковые пробирки типа Vacuette объёмом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2-3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.2 Транспортировка и хранение исследуемого материала

ВНИМАНИЕ! Время от взятия материала до получения плазмы не должно превышать 6 часов.

Транспортировать и хранить образцы крови до начала исследования при температуре от 2 °С до 8 °С.

6.3 Получение плазмы крови

6.3.1 Пробирки с кровью центрифугировать при 3000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

6.3.2 После центрифугирования отобрать автоматическим дозатором верхнюю фракцию и перенести в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

Полученная плазма готова для выделения НК.

При необходимости хранить полученную плазму при температуре минус 20 °С не более 3 месяцев.

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

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение нуклеиновых кислот из плазмы крови

Примечание – Перед началом работы необходимо достать из холодильника комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот и проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе. В случае выпадения осадка флакон прогреть при температуре 65 °С до полного растворения осадка.

ВНИМАНИЕ! На данном этапе используйте только наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.

7.1.1 Промаркируйте необходимое количество новых пробирок объемом 1,5 мл с учетом пробирки для отрицательного контрольного образца (К-).

Например, для исследования 10 образцов необходимо промаркировать 11 пробирок (10 для исследуемых образцов и одна пробирка для К-).

7.1.2 Внесите во все промаркированные пробирки по 10 мкл предварительно перемешанного внутреннего контрольного образца (ДНК-ВК).

7.1.3 Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки. Закройте крышки пробирок.

Примечание – Для предотвращения контаминации следует перед внесением образцов открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего

7.1.4 Внесите по 100 мкл предварительно перемешанной плазмы в пробирки для исследуемых образцов. В пробирку, промаркированную К-, добавить 100 мкл отрицательного контрольного образца.

ВНИМАНИЕ! Пробирки с исследуемыми образцами и отрицательным контрольным образцом необходимо обрабатывать по единой схеме.

7.1.5 Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на вортексе в течение 3-5 с дважды.

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

7.1.6 Термостатируйте пробирки в течение 15 мин при температуре 65 °С, осадите конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

7.1.7 Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхните на вортексе в течение 3-5 с дважды.

7.1.8 Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

7.1.9 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.1.10 Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора № 1, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.

7.1.11 Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение пяти минут при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

7.1.12 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.1.13 Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора № 2, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.

7.1.14 Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение пяти минут при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

7.1.15 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.1.16 Откройте крышки пробирок и высушите осадок при температуре 65 °С в течение пяти минут.

7.1.17 Добавьте к осадку 25 мкл буфера для растворения. Осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3-5 с.

7.1.18 Прогрейте пробирки при температуре 65 °С в течение 10 минут. Осадите капли центрифугированием пробирок при 13000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации.

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

Препарат ДНК можно хранить при минус 20 °С в течение одного месяца или при минус 70 °С в течение одного года.

7.2 Проведение полимеразной цепной реакции

7.2.1 Промаркируйте необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для исследуемых образцов плазмы крови, положительного контрольного образца ДНК К+ и отрицательного контрольного образца К-.

Например, необходимо проанализировать 10 образцов. Нужно промаркировать 10 пробирок для исследуемых образцов, одну пробирку для К+ и одну пробирку для К-. Общее количество пробирок – 12.

ВНИМАНИЕ! При использовании для учёта результатов амплификации детектора флуоресцентного (формат «с флуоресцентной детекцией по конечной точке») необходимо промаркировать дополнительно две пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации (всего две нормировочные пробирки ФОН) для контроля фона флуоресценции.

Например, необходимо проанализировать 10 образцов. Нужно промаркировать 10 пробирок для исследуемых образцов, одну пробирку для К+, одну пробирку для К- и две пробирки ФОН. Общее количество пробирок – 14.

7.2.2 Разморозьте при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С ПЦР-буфер из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации.

7.2.3 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаq на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с, затем центрифугируйте при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.4 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq. Смешайте в отдельной пробирке:

- 10х(N+1) мкл ПЦР-буфера,
- 0,5х(N+1) мкл полимеразы ТехноТаq,

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

где N – количество промаркированных пробирок с учетом К- и К+.

Например, необходимо проанализировать 10 образцов. Промаркированных пробирок – 12.

Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq для 13 (12+1) пробирок, т.е. 130 мкл ПЦР-буфера плюс 6,5 мкл полимеразы ТехноТаq.

7.2.5 Перемешайте смесь на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3-5 с при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

Смесь можно хранить при комнатной температуре не более одного часа.

7.2.6 Добавьте во все промаркированные пробирки (за исключением пробирок ФОН), не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq. В пробирки, маркированные ФОН, добавьте по 10 мкл ПЦР-буфера.

7.2.7 Добавьте в каждую пробирку по одной капле минерального масла (около 20 мкл). Закройте крышки пробирок.

7.2.8 Встряхните пробирки с препаратом ДНК на микроцентрифуге-вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3-5 с.

7.2.9 Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл полученного из образцов препарата ДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов.

7.2.10 Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК, в пробирки, промаркированные К- и ФОН. Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца ДНК, в пробирку, промаркированную К+.

7.2.11 Центрифугируйте пробирки при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

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

7.2.12 Установите все пробирки в амплификатор или термостат программируемый.

7.2.12.1 Формат «с детекцией в режиме реального времени»

Для приборов ДТпрайм, ДТлайт, ДТ-96:

Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «HBV_HCV.ini». При последующих постановках добавьте в протокол тест «HBV_HCV», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста «HBV_HCV» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 2.

Таблица 2 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт», «ДТ-96»

Формат «с детекцией в режиме реального времени»

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	94	5	00	1		Цикл
2	94	0	10	50		Цикл
	62	0	20		√	
3	10	…	…	Хранение		Хранение

√- режим оптических измерений

Таблица 3 – Программа амплификации для прибора Rotor-Gene Q

Формат «с детекцией в режиме реального времени»

№ /Cycling	Температура, °С /Temperature	Время, с /Hold Time, s	Количество циклов /Cycle Repeats
Cycling	80	300	1 time
Cycling 2	94	10	50 times
	58	5	
	62 √	25	

√- режим оптических измерений

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

Для приборов iCycler iQ и iCycler iQ5:

Включите прибор и блок питания оптической части прибора, оставьте для прогрева на 30 минут. Запустите программное обеспечение iCycler (или Bio-Rad iQ5). При первой постановке создайте и сохраните новый протокол. При последующих постановках выберите сохраненный протокол, настройте конфигурацию планшета (файл с данными о характеристике образцов и их расположении в планшете) и проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл.

Таблица 4 – Программа амплификации для амплификатора iCycler iQ

Формат «с детекцией в режиме реального времени»

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo.					
1	1				
		1	00:30	80,0	
		2	05:00	94,0	
2	5				
		1	00:20	94,0	
		2	00:30	62,0	
3	2				
		1	00:20	80,0	Real Time
Программа амплификации					
4	45				
		1	00:10	94,0	
		2	00:20	62,0	Real Time
5		…	…	10,0	storage

Таблица 5 – Программа амплификации для амплификатора iCycler iQ5 (при использовании Persistent Well Factor)

Формат «с детекцией в режиме реального времени»

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	PCR/Melt Data Acquisition
1	1				
		1	05:00	94,0	
2	50				
		1	00:10	94,0	
		2	00:20	62,0	Real Time
3	1				
		1	01:00	10,0	

7.2.12.2 Форматы «с флуоресцентной детекцией по конечной точке» и «с детекцией методом гель-электрофореза»

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

Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, в режиме, приведённом для амплификаторов с активным регулированием (таблица 5).

Примечание – Более подробное описание программирования и управления термостатом «Терцик» содержится в инструкции к прибору (см. «Руководство пользователя»).

Таблица 5 – Прогамма амплификации для амплификатора «Терцик».

Формат «с флуоресцентной детекцией по конечной точке» и «с детекцией методом гель-электрофореза»

Алгоритм регулирования: «быстрый».

№ п.п.	Температура, °С	Время		Количество циклов
		мин	с	
1	94,0	05	00	1
2	94,0 62,0	00 00	10 20	50
3	10,0	…	…	Хранение

Примечания

1 Продукты амплификации можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение одного месяца или при температуре минус 20 °С в течение 12 месяцев.

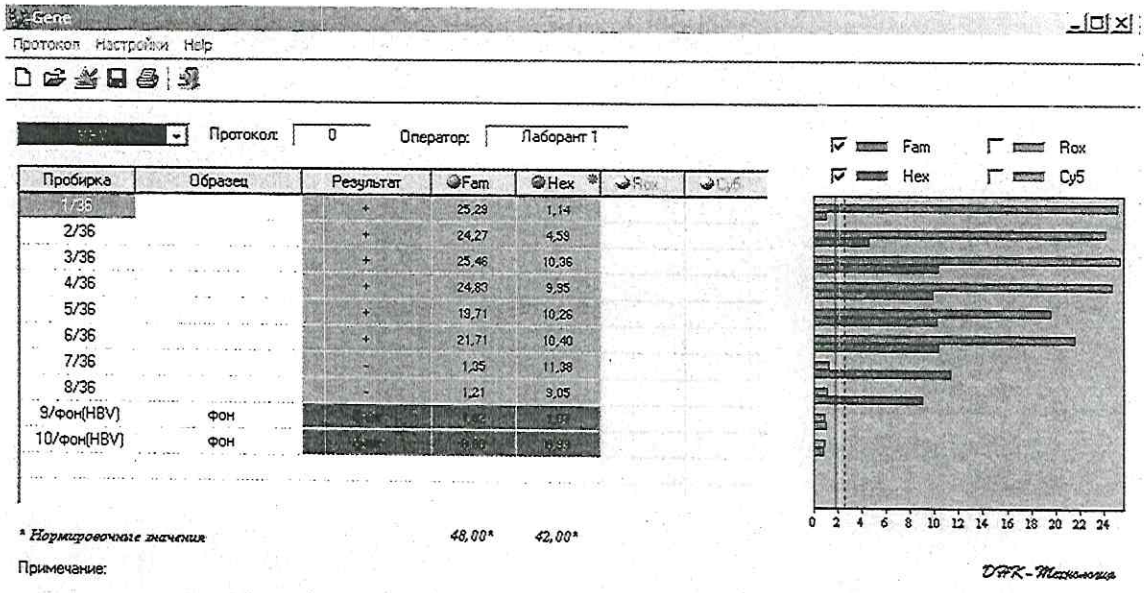
2 При работе с наборами в формате «с флуоресцентной детекцией по конечной точке» готовые нормировочные пробирки ФОН допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК. Нормировочные пробирки хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение одного месяца в темном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру от 18 °С до 25 °С, для чего за один час до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация результатов амплификации с использованием ПЦР-детектора.

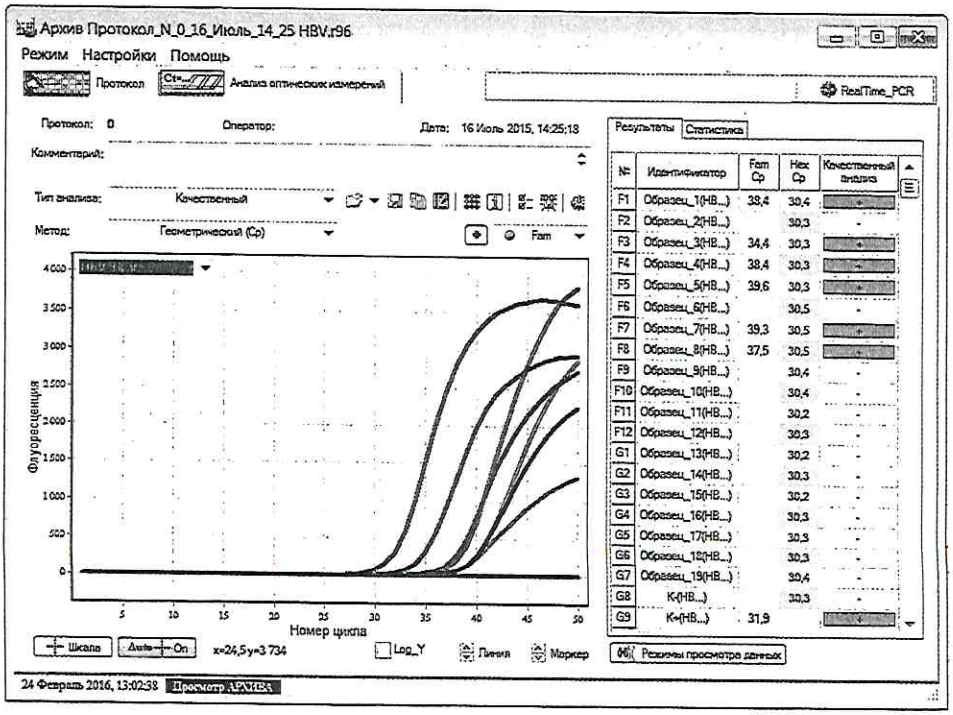
После прохождения реакции амплификации пробирки поместить в ПЦР-детектор, оформить протокол и провести регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10, для внутреннего контроля – 2,50).

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



8.1.1 Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов ДТпрайм, ДТлайт, ДТ-96

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство по эксплуатации» для ДТпрайм, ДТлайт, ДТ-96).



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

8.1.2 Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов iCycler iQ и iCycler iQ5

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство пользователя» для iCycler iQ / iCycler iQ5).

8.1.3 Регистрация результатов амплификации с использованием гель-электрофореза

8.1.3.1 Открыть крышки пробирок с продуктами амплификации и проколоть в парафине отверстие диаметром примерно 2-3 мм с помощью стальной проволоки. После прокалывания каждой пробирки проволоку промыть в емкости с водопроводной водой.

8.1.3.2 Для приготовления буфера для электрофореза содержимое пакета со смесью для электрофореза перенести в мерную колбу объёмом 1 л, добавить приблизительно 700 мл дистиллированной воды, перемешать до полного растворения и довести дистиллированной водой до метки.

Примечание – Буферный раствор для электрофореза можно хранить при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С в течение одной недели или при температуре от 2 °С до 8 °С в течение одного месяца.

8.1.3.3 Заполнить камеру для электрофореза буферным раствором для электрофореза и поместить пластину с агарозным гелем в камеру для электрофореза.

Примечание – Буферный раствор для электрофореза должен покрывать пластину с гелем слоем приблизительно 3-5 мм. При работе с агарозным гелем следует обязательно надевать резиновые перчатки!

8.1.3.4 Осторожно внести 7,0 мкл продуктов амплификации из каждой амплификационной пробирки в соответствующую лунку агарозного геля под буферный раствор.

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

8.1.3.5 Установить крышку камеры для электрофореза и подключить источник постоянного тока. Электрофорез проводить при напряжении 20 Вольт/см в течение 10 мин (при ширине камеры 10 см напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 200 В).

8.1.3.6 После окончания электрофореза отключить источник постоянного тока, снять крышку с камеры.

8.1.3.7 Вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины, подцепив его с края, и поместить на экран трансиллюминатора.

8.1.3.8 Надеть защитную маску или установить защитный экран, включить трансиллюминатор и проанализировать полученные результаты. Продукт амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учет результатов реакции с помощью ПЦР-детектора или детектирующего амплификатора

9.1.1 Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором.

9.1.2 В биологических образцах, содержащих ДНК вируса гепатита В (специфический продукт):

- программа ПЦР-детектора фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается;
- детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции для специфического продукта. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается.

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

9.1.3 В биологических образцах, не содержащих ДНК вируса гепатита В:

- программа ПЦР-детектора при положительном результате амплификации внутреннего контрольного образца фиксирует отрицательный результат;
- детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции внутреннего контрольного образца и отсутствие экспоненциального роста кривой для специфического продукта.

9.1.4 Результат оценивается как недостоверный в случае:

- отрицательного результата на наличие ДНК вируса гепатита В и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца (ПЦР-детектор).
- отсутствия экспоненциального роста уровня флуоресценции для специфического продукта и для внутреннего контрольного образца (детектирующий амплификатор).

Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие клинического материала.

9.1.5 Программа ПЦР-детектора фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфического продукта попадает в зону неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учет не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.1.4).

9.1.6 При получении положительного результата (ПЦР-детектор) или экспоненциального роста флуоресценции (детектирующий амплификатор) для специфического продукта в отрицательном контрольном образце К- результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

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

9.2 Учет результатов реакции с помощью гель-электрофореза

9.2.1 В положительных образцах должны быть видны полосы оранжево-красного цвета на уровне полосы положительного контрольного образца, соответствующие фрагменту генома вируса гепатита В размером 295 п.н. Наличие или отсутствие полосы, соответствующей внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., в этом случае в учет не принимают.

9.2.2 В отрицательных образцах, в том числе в отрицательном контрольном образце, светящиеся полосы оранжево-красного цвета, соответствующие фрагменту генома вируса гепатита В размером 295 п.н. должны отсутствовать, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., должна быть отчетливо видна.

9.2.3 В случае отсутствия в исследуемом образце полосы оранжево-красного цвета, соответствующей фрагменту генома вируса гепатита В размером 295 п.н. и отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н. результат считают недостоверным.

Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие клинического материала.

9.2.4 В случае наличия полосы, соответствующей фрагменту генома вируса гепатита В размером 295 п.н., в отрицательном контрольном образце К- результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

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

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

10.1 Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.

10.2 Комплект реагентов для ПЦР-амплификации, кроме пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации и пробирки с положительным контрольным образцом, следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.

10.3 Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК, комплект для детекции ДНК методом гель-электрофореза, пробирки (стрипы) со смесью для амплификации, запечатанной парафином и положительный контрольный образец, следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

10.4 Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот и смесь для амплификации, запечатанную парафином следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора.

10.5 При хранении лизирующего раствора допускается выпадение небольшого количества осадка, который растворяется прогреванием при 65 °С.

10.6 Смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq следует хранить при температуре от 18 °С до 25 °С не более одного часа.

10.7 Раствор буфера для электрофореза можно хранить при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С не более семи дней или при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного месяца.

10.8 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.9 Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.10 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

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

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684 и МУ 1.3.2569.

11.2 Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-2021.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

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

Приложение 1

Интерпретация результатов ПЦР

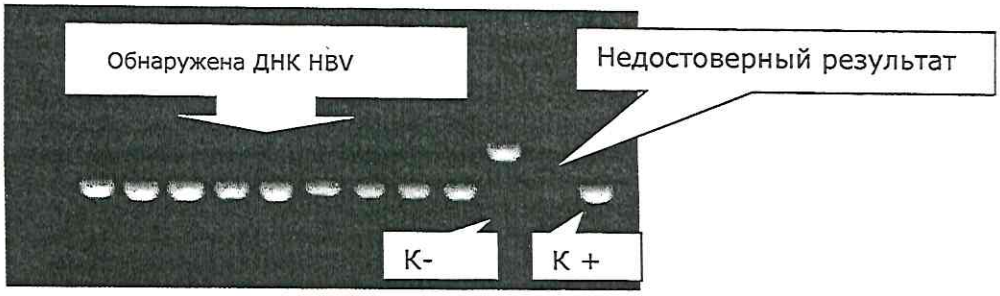
Образы	Формат с детекцией в режиме реального времени «Real-time»		Формат с флуоресцентной детекцией по конечной точке «Flash»	Интерпретация**
	Fam (искомая ДНК)	Hex (внутренний контроль)*		
Анализируемые образцы	Ср/Ct указан	Не учитывается	«+»	Обнаружена ДНК HBV («+»)
	Ср не указан	Ср 29-34	«-»	Не обнаружена ДНК HBV («-»)
	Ср не указан	Ср не указан	«нд»	Недостоверный результат («нд»)
Положительный контрольный образец	Ср/Ct <34	Не учитывается	«+»	Положительный результат («+»)
Отрицательный контрольный образец	Ср не указан	Ср 29-34	«-»	Отрицательный результат («-»)

* если значение Ср (Ct) по каналу Hex больше указанного, результат недостоверный!

** в скобках представлен результат в графе «Качественный анализ» для приборов ДТ*лайт*, ДТ*прайм* и ДТ-96.

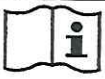
Интерпретация результатов с помощью гель-электрофореза

Образец	Специфический фрагмент (295 п.н.)	Внутренний контроль (560 п.н.)	Интерпретация
Образец плазмы	+	Не учитывать	Обнаружена ДНК вируса HBV
	-	+	Не обнаружена ДНК вируса HBV
	-	-	Недостоверный результат
Положительный контрольный образец	+	Не учитывать	Положительный результат
Отрицательный контрольный образец	-	+	Отрицательный результат



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

Символы, используемые при маркировке набора

	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
	Температурный диапазон
	Количество тестов
	Годен до
	Серия набора реагентов
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению
	Каталожный номер
	Адрес изготовителя
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов ВГБ-ГЕН, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, к.6. тел./факс +7 (495) 980-45-55, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки: 8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный),

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/customer_support/

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