



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для количественного
определения ДНК вируса гепатита Б (HBV)
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

ГЕПАТОГЕН-Б КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ

Регистрационное удостоверение МЗ СР РФ
ФСР 2008/03506

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для количественного определения ДНК вируса гепатита Б (HBV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

ГЕПАТОГЕН-Б КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ

1. НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1.** Набор реагентов ГЕПАТОГЕН-Б КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ предназначен для количественного определения ДНК вируса гепатита Б (Hepatitis B virus) в образцах плазмы крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.
- 1.2.** Набор реагентов ГЕПАТОГЕН-Б КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ может быть использован в клинической практике для диагностики гепатита Б и оценки эффективности противовирусной терапии.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

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

В реакционную смесь для проведения ПЦР введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, 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.

Использование калибровочных образцов (СТ) позволяет построить калибровочную прямую, при помощи которой можно

определить концентрацию ДНК HBV в исследуемых образцах плазмы крови.

Исследование с использованием набора реагентов ГЕПАТОГЕН-Б КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация ДНК HBV в режиме реального времени.

На стадии выделения ДНК в реакционную смесь добавляют внутренний контрольный образец (ДНК-ВК), предназначенный для оценки эффективности всех этапов исследования. ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца, помечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет раздельно регистрировать результаты амплификации внутреннего контрольного образца и искомой ДНК.

Для проведения количественной оценки ДНК HBV, набор реагентов ГЕПАТОГЕН-Б КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ включает калибровочные образцы в двух концентрациях: $1,0 \times 10^6$ копий/мл и $3,0 \times 10^3$ копий/мл.

Для проведения ПЦР используют детектирующий амплификатор.

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

2.2. Состав набора

Набор состоит из трёх комплектов:

1. Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот включает:

- лизирующий раствор – 1 флакон (30 мл);
- реагент для преципитации – 1 флакон (40 мл);
- промывочный раствор №1 – 1 флакон (50 мл);
- промывочный раствор №2 – 1 флакон (30 мл);
- буфер для растворения – 4 пробирки (по 1,25 мл);

- отрицательный контрольный образец («К-») – 2 пробирки (по 1,5 мл);
- внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл);
- внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл).

2. Калибровочные образцы:

- HBV-СТ1 ($1,0 \times 10^6$ копий/мл) – 1 пробирка (75 мкл);
- HBV-СТ2 ($3,0 \times 10^3$ копий/мл) – 1 пробирка (75 мкл).

3. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 96 пробирок (по 20 мкл);
- Taq-полимеразу – 1 пробирка (50 мкл);
- буферный раствор «ПЦР-буфер» – 2 пробирки (по 500 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- положительный контрольный образец ДНК («К+») – 1 пробирка (500 мкл).

2.3. Время проведения анализа – 4 ч.

2.4. Набор, включающий 96 пробирок со смесью для амплификации, рассчитан на проведение 44 определений неизвестных образцов (в двух повторах каждый).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая специфичность: набор реагентов выявляет все субтипы вируса гепатита В.

В образцах, содержащих ДНК HBV, определяется концентрация вируса в исследуемом материале. В образцах, не содержащих ДНК HBV, результат исследования должен быть отрицательным.

Чувствительность анализа: не более 300 геном-эквивалентов (копий) ДНК HBV на 1,0 мл плазмы.

Линейный диапазон концентраций ДНК HBV, определяемых

детектирующим амплификатором, составляет $7,5 \times 10^2 - 1,0 \times 10^8$ копий/мл образца, отклонение от линейности не превышает 7%.

Коэффициент вариаций результатов определений – не более 7%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1.** Потенциальный риск применения набора – класс 3 (ГОСТ Р 51609–2000).
- 4.2.** Мерами предосторожности при работе с комплектом реагентов является соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).
- 4.3.** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.
- 4.4.** Работу с набором реагентов и анализируемыми образцами следует проводить в одноразовых медицинских перчатках без талька.
- 4.5.** На стадиях приготовления реакционной смеси и обработке образцов крови необходимо использовать только новые наконечники и пробирки.
- 4.6.** Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов крови.
- 4.7.** Выделение ДНК следует проводить в ламинарных шкафах с включённым ламинарным потоком. Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.
- 4.8.** Для предотвращения контаминации этапы выделения ДНК и ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабжённых комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.
- 4.9.** Всё лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

- 4.10.** Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после окончания работ в течение 1 часа.
- 4.11.** Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569-09.

При работе с набором реагентов ГЕПАТОГЕН-Б КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор детектирующий ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»), iCycler iQ (Bio-Rad) или аналоги;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 40–95°C;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости: 0,5–10 мкл, 5–40 мкл, 40–200 мкл, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой «RNAase-free, DNAase-free» объёмом 1–20 мкл; 1–50 мкл; 1–200 мкл; 100–1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские;
- контейнер с дезинфицирующим раствором.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Взятие образцов периферической крови

Взятие крови проводится в пластиковые пробирки объемом 2,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2–3 раза.

В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия.

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 2–8°C.

6.3. Получение плазмы

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

6.3.2. После центрифугирования отобрать автоматической пипеткой верхнюю фракцию (плазма) и перенести в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

Хранить полученную плазму при температуре минус 20°C не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение ДНК 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 лизирующий раствор прогреть при 65°C до полного растворения осадка.

На данном этапе используйте только наконечники с маркировкой «RNAase-free, DNAase-free».

Для повышения достоверности получаемых результатов на этапе выделения ДНК исследуемые образцы необходимо продублировать (для одного исследуемого образца провести две отдельные пробоподготовки).

- 7.1.1. Для исследования необходимо промаркировать следующее количество пластиковых пробирок объёмом 1,5 мл:
- по 2 пробирки на каждый исследуемый образец плазмы;
 - 1 пробирку для отрицательного контрольного образца («К-»);
 - 1 пробирку для положительного контрольного образца («К+»).
- Например: для исследования 10 образцов необходимо промаркировать 22 пробирки (20 пробирок для исследуемых образцов, 1 пробирка «К+», 1 пробирка «К-»).
- 7.1.2. Внести во все промаркированные пробирки по 10 мкл внутреннего контрольного образца (ДНК-ВК).
- 7.1.3. Добавить в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь краёв пробирки.
- 7.1.4. В пробирки для исследуемых образцов добавить по 100 мкл плазмы крови. В пробирку, промаркированную «К-», добавить 100 мкл отрицательного контрольного образца; в пробирку, промаркированную «К+», добавить 100 мкл положительного контрольного образца ДНК.
- 7.1.5. Плотно закрыть крышки пробирок, встряхнуть на вортексе в течение 3–5 с.
- 7.1.6. Термостатировать пробирки в течение 15 мин при температуре 65°C, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре (18–25°C).
- 7.1.7. Добавить в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхнуть на вортексе в течение 3–5 с.
- 7.1.8. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре (18–25°C).
- 7.1.9. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 7.1.10. Добавить к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 7.1.11. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.1.12. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную

жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

- 7.1.13. Добавить к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 7.1.14. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.1.15. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 7.1.16. Открыть крышки пробирок и высушить осадок при температуре 65 °С в течение 5 мин.
- 7.1.17. Добавить к осадку 25 мкл буфера для растворения и прогреть пробирки при температуре 65°С в течение 10 мин. Встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3–5 с.
- 7.1.18. Осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

Препарат ДНК готов для постановки полимеразной цепной реакции.

Препарат ДНК можно хранить при температуре минус 20°С не более 1 месяца или при температуре минус 70°С не более одного года.

7.2. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

- 7.2.1. Разморозить при комнатной температуре (18–25°С) ПЦР-буфер из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации, затем тщательно перемешать на вортексе ПЦР-буфер и Taq-полимеразу. Осадить капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре (18–25°С).
- 7.2.2. Промаркировать необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для исследуемых образцов плазмы крови, положительного контрольного образца ДНК «К+», отрицательного контрольного образца «К–» и по три пробирки для каждого из калибровочных образцов («СТ1» и «СТ2»).
- 7.2.3. В отдельной пластиковой пробирке приготовить смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой:
 - 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,
 - 0,5 x (N+1) мкл Taq-полимеразы,где N – количество промаркированных пробирок.

ВНИМАНИЕ! Таq-полимеразу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше времени.

7.2.4. Смесь перемешать на вортексе и осадить капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре (18–25°C).

Смесь можно хранить при комнатной температуре не более 1 часа.

7.2.5. Во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл тщательно перемешанной смеси ПЦР-буфера с Таq-полимеразой.

7.2.6. В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла (20 мкл), закрыть пробирки.

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы ДНК наконечниками с фильтрами.

7.2.7. Пробирки с препаратом ДНК встряхнуть на микроцентрифуге/вортексе и осадить капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 с.

7.2.8. Внести в пробирки (кроме пробирок «К–», «К+», «СТ1» и «СТ2»), по 5,0 мкл препарата ДНК, не повреждая слой парафина.

7.2.9. В пробирку, промаркированную «К–», не повреждая слой парафина, внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку.

7.2.10. В пробирку, промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку.

7.2.11. В пробирки, маркированные «СТ1» и «СТ2», не повреждая слой парафина, внести по 5,0 мкл соответствующего калибровочного образца.

7.2.12. Осадить капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре (18–25°C).

7.2.13. Установить все пробирки в блок детектирующего амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведённом в таблицах 1 и 2, с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл.

Таблица 1

Режим амплификации для детектирующих амплификаторов
ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№ блока	Температура, °C	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	2	00	1		Цикл
	94,0	1	00			
2	94,0	0	10	50		Цикл
	62,0	0	20		√	
3	10,0	Хранение		Хранение

Таблица 2

Режим амплификации для детектирующего амплификатора
iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

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	01:00	94,0	
2	5	1	00:20	94,0	
		2	00:30	62,0	
3	2	2	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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»), iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Для проведения количественного определения ДНК HBV необходимо оформить протокол исследования, в котором должны быть указаны маркировка анализируемых образцов и концентрация калибровочных образцов.

После окончания амплификации прибор автоматически построит калибровочную прямую, определит концентрацию вируса

в анализируемых образцах и сформирует протокол по результатам анализа.

Для более подробного описания процедуры проведения анализа см. «Руководство по эксплуатации» для ДТ-322, ДТ-96, «Руководство пользователя» для iCycler iQ.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

ВНИМАНИЕ! Для приборов ДТ-322 и ДТ-96 указаны значения вирусной нагрузки для Метода анализа «Геометрический (Ср)».

- 9.1.** Эффективность амплификации должна составлять 90–100%.
- 9.2.** Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с приборами ДТ-322, ДТ-96 и iCycler iQ.
- 9.3.** Если значение вирусной нагрузки находится в пределах $7,5 \times 10^2$ – $1,0 \times 10^8$ копий/мл, результат определяется как положительный с указанием вирусной нагрузки в образце (копий/мл).
- 9.4.** Если значение вирусной нагрузки выходит за рамки линейного диапазона, то для образцов с низкой вирусной нагрузкой (значение, определённое программой, меньше $7,5 \times 10^2$ копий/мл) результат фиксируется как: «менее $7,5 \times 10^2$ копий/мл». Для образцов с высокой вирусной нагрузкой (значение, определённое программой, больше $1,0 \times 10^8$ копий/мл) результат фиксируется как: «более $1,0 \times 10^8$ копий/мл».
- 9.5.** В отрицательном контрольном образце программа фиксирует отрицательный результат на наличие ДНК HBV и положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца.
- 9.6.** В положительном контрольном образце определяемая концентрация ДНК должна находиться в диапазоне $2,2 \times 10^4$ – $7,1 \times 10^4$ копий/мл.
- 9.7.** В случае отрицательного результата на наличие ДНК HBV (канал FAM) и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца (канал HEX), результат трактуется как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование.
- 9.8.** При получении положительного результата на наличие ДНК

HBV в отрицательном контрольном образце, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проверить специальных мероприятий для устранения контаминации и повторное проведение исследования всей постановочной серии.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

- 10.1.** Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.
- 10.2.** Комплект калибровочных образцов и комплект реагентов для ПЦР-амплификации, кроме пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить при температуре минус 20°C в течение всего срока годности. Допускается хранение калибровочных образцов, ПЦР-буфера, минерального масла и положительного контрольного образца ДНК при температуре 2–8°C в течение всего срока годности набора.
- 10.3.** Пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, и комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот следует хранить в тёмном месте при 2–8°C в течение всего срока годности набора.

По вопросам, касающимся качества набора ГЕПАТОГЕН-Б КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ, следует обращаться в ООО «НПО ДНК-Технология» по адресу:

117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6

Тел./факс + 7 (495) 980-45-55

E-mail: help@dna-technology.ru

www.dna-technology.ru

и в Институт государственного контроля лекарственных средств ФГУ «НЦЭСМП» Росздравнадзора:

117246, Москва, Научный проезд, д. 14а

Тел.: +7 (495) 120-60-95, 120-60-96

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

<http://www.dna-technology.ru/support/>

Номер 131-4
25.05.11

ООО «НПО ДНК-Технология»
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс +7 (495) 980-45-55
E-mail: help@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru