



## ИНСТРУКЦИЯ

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

### ВГБ-ГЕН

Регистрационное удостоверение МЗ СР РФ  
ФСР 2008/03507

**ВНИМАНИЕ!** Изучите инструкцию перед началом работы



## ИНСТРУКЦИЯ

### по применению набора реагентов для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) методом полимеразной цепной реакции

#### ВГБ-ГЕН

#### 1. НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1. Набор реагентов ВГБ-ГЕН предназначен для выявления ДНК вируса гепатита В (Hepatitis B virus) в образцах плазмы крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).
- 1.2. 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. Принцип действия

Набор реагентов ВГБ-ГЕН основан на использовании процесса амплификации ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

Внутренний контрольный образец добавляется в исследуемый образец на стадии выделения нуклеиновых кислот и предназначен для оценки качества всех этапов исследования.

В наборах в формате «FLASH» и «Real-time» в реакционную смесь введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами.

ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации

ДНК вируса гепатита В и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР можно использовать детектирующие амплификаторы, специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы) или метод электрофореза в агарозном геле.

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

В зависимости от способа детекции результатов амплификации набор выпускается в трёх форматах:



Формат «FLASH» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора (флуоресцентная детекция по конечной точке).



Формат «Real-time» предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью детектирующих амплификаторов (в режиме реального времени).



Формат «Форез» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Набор состоит из трёх комплектов:

### 1. Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК) 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).

Комплект является универсальным для всех форматов.

**Примечание.** При хранении допускается выпадение небольшого количества осадка в лизирующем растворе, который растворяется прогреванием лизирующего раствора при 65°C.

## **2. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации** включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 100 пробирок (по 20 мкл) для форматов «FLASH» и «Форез», 96 пробирок (по 20 мкл) для формата «Real-time»;
- Taq-полимеразу – 1 пробирка (50 мкл);
- ПЦР-буфер – 2 пробирки (по 500 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- положительный контрольный образец («К+») – 1 пробирка (150 мкл).

В состав смеси для амплификации, запечатанной парафином, входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры. В наборах форматов «FLASH» и «Real-time» в состав смеси для амплификации входят флуоресцентные зонды.

## **3. Дополнительно, по запросу потребителей возможна поставка комплекта реагентов для детекции ДНК методом гель-электрофореза, комплект включает:**

- смесь для электрофореза – 1 пакет (16,9 г);
- агарозный гель – 5 пластин.

Комплект используется в наборе формата «Форез».

**2.3.** Время проведения анализа – 4 ч.

**2.4.** Набор рассчитан на проведение 96/100 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

### **3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

#### **3.1. Специфичность анализа**

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК вируса гепатита Б, после проведения реакции амплификации детектирующий амплификатор (формат «Real-time») или ПЦР-детектор (формат «FLASH») должен регистрировать положительный результат. При использовании метода гель-электрофореза (формат «Форез») должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома вируса гепатита Б размером 295 п.н. (пар нуклеотидов).

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК вируса гепатита Б, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должен регистрировать отрицательный результат. При использовании метода гель-электрофореза полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома вируса гепатита Б размером 295 п.н. (пар нуклеотидов) должна отсутствовать, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., должна быть отчетливо видна.

#### **3.2. Аналитическая чувствительность**

Чувствительность анализа: 200 копий на 1,0 мл плазмы.

#### **3.3. Диагностическая чувствительность: 99,8%.**

#### **3.4. Диагностическая специфичность: 100%.**

### **4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

**4.1.** Мерами предосторожности при работе с набором 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.).

**4.2.** Потенциальный риск применения набора – класс 26 (ГОСТ Р 51609–2000).

**4.3.** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

**4.4.** Работать с набором в одноразовых резиновых перчатках без талька.

- 4.5.** При работе с набором следует использовать только новые наконечники и пробирки.
- 4.6.** Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов крови.
- 4.7.** Выделение НК 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, проведения ПЦР и электрофореза следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабжённых комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.
- 4.9.** Все 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.** Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- 4.11.** Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.
- 4.12.** Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 51609–2000. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.
- 4.13.** Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после окончания работ в течение 1 часа.
- 4.14.** При работе с включённым трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.
- 4.15.** Запрещается снимать крышку с электрофоретической

камеры, если она подключена к источнику питания.

## **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 ВГБ-ГЕН требуются следующие оборудование и материалы:

- обычный амплификатор (для форматов «Форез» и «FLASH») или детектирующий амплификатор (для формата «Real-time»);
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65°C;
- микроцентрифуга/вортекс со скоростью вращения 1000–3000 об/мин;
- насос с колбой-ловушкой для удаления надсадочных жидкостей;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл, 2,5 мл;
- пипетки автоматические одноканальные с переменным объёмом: 0,5–10 мкл, 5–40 мкл, 40–200 мкл, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для автоматических пипеток с маркировкой «RNase-free, DNase-free» объёмом 1–20 мкл, 1–50 мкл, 1–200 мкл, 100–1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские;
- контейнер с дезинфицирующим раствором.

При работе с набором в формате «FLASH» для детекции результатов требуется:

- ПЦР-детектор.

При детекции методом электрофореза требуются:

- источник постоянного тока;
- камера для электрофореза;
- трансиллюминатор;
- колба мерная вместимостью 1,0 л;
- дистиллированная вода;
- стальная проволока диаметром 1,0 мм.

## **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. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 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 2–8°C.

### **6.3.** Получение плазмы

6.3.1. Пробирки с кровью центрифугировать при 3000 об/мин в течение 20 мин.

6.3.2. После центрифугирования отобрать автоматической пипеткой 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°C не более 3 месяцев.

## **7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

**7.1.** Выделение нуклеиновых кислот из биологического материала

**Примечание.** В случае выпадения осадка в лизирующем растворе, флакон прогреть при 65°C до полного растворения осадка.

**ВНИМАНИЕ!** На данном этапе используйте только наконечники с маркировкой «RNase-free, DNase-free».

- 7.1.1. Промаркировать необходимое количество новых пластиковых пробирок объёмом 1,5 мл с учётом пробирок для отрицательного контрольного образца «К-».
- 7.1.2. Внести по 10 мкл внутреннего контрольного образца (ДНК-ВК) в каждую пластиковую пробирку.
- 7.1.3. Внести по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.
- 7.1.4. Добавить в пробирки для исследуемых образцов 100 мкл исследуемого образца (плазмы крови). В пробирку, промаркированную «К-», добавить 100 мкл отрицательного контрольного образца.
- 7.1.5. Плотно закрыть крышки пробирок, перемешать на вортексе в течение 3–5 сек и осадить капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 7.1.6. Термостатировать исследуемые образцы и «К-» при 65°C в течение 15 мин, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с.
- 7.1.7. Добавить 400 мкл реагента для преципитации и перемешать пробу на вортексе в течение 3–5 сек.
- 7.1.8. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин.
- 7.1.9. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 7.1.10. Добавить к осадку 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.
- 7.1.12. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 7.1.13. Добавить к осадку 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.
- 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 65°C в течение 5 мин.
- 7.1.17. Добавить к осадку 25 мкл буфера для растворения и прогреть пробирки при 65°C в течение 10 мин, встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3–5 сек, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.

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

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

## **7.2.** Проведение полимеразной цепной реакции

- 7.2.1. Разморозить при комнатной температуре (18–25°C) ПЦР-буфер из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации, затем тщательно перемешать на вортексе и осадить капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 7.2.2. Промаркировать необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, с учётом пробирок для положительного контрольного образца «К+» и отрицательного контрольного образца «К-». При использовании ПЦР-детектора для учёта результатов амплификации (формат «FLASH») промаркировать дополнительно две пробирки «ФОН» для контроля фона флуоресценции.
- 7.2.3. В отдельной пластиковой пробирке, предварительно перемешав реагенты, приготовить смесь ПЦР-буфера с Таq-полимеразой:
  - 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,
  - 0,5 x (N+1) мкл Таq-полимеразы,где N+1 – количество анализируемых образцов с учётом «К-» и «К+» (N) с запасом на 1 образец.

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

Смесь можно хранить при комнатной температуре (18–25°C) не более 1 ч.

- 7.2.4. Перемешать приготовленную смесь ПЦР буфера с Taq-полимеразой на вортексе и осадить капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 7.2.5. Во все амплификационные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл тщательно перемешанной смеси ПЦР-буфера с Taq-полимеразой.
- 7.2.6. В пробирки, маркированные «ФОН», внести по 10 мкл ПЦР-буфера.
- 7.2.7. В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла (20 мкл), закрыть пробирки.
- 7.2.8. Внести в амплификационные пробирки (кроме пробирок «К–», «К+» и «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата ДНК.

**Примечание.** Во избежание контаминации вносить образцы ДНК в амплификационные пробирки наконечниками с фильтрами.

- 7.2.9. В пробирки, промаркированные «К–» и «ФОН», внести по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК. В пробирку, промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.2.10. Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведённом в таблицах 1–3, с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл.

**Примечание.** Продукты амплификации можно хранить при температуре 2–8°C в течение 1 месяца или при температуре минус 20°C в течение 1 года.

Таблица 1. Формат «Форез»

Режим амплификации для амплификатора Терцик  
(ООО «НПО ДНК-Технология»)  
Алгоритм регулирования – «точный»

№ блока	Для амплификаторов с активным регулированием			Число циклов
	Температура, °C	Время		
		мин	сек	
1	94,0	1	30	1
2	94,0 64,0 72,0	0 0 0	20 5 5	5
3	94,0 64,0 72,0	0 0 0	5 5 5	40
4	10,0	...	...	хранение

Таблица 2. Формат «FLASH»

Режим амплификации для амплификатора Терцик  
(ООО «НПО ДНК-Технология»)  
Алгоритм регулирования – «точный»

№ блока	Для амплификаторов с активным регулированием			Число циклов
	Температура, °C	Время		
		мин	сек	
1	94,0	1	00	1
2	94,0 64,0 67,0	0 0 0	5 5 5	5
3	94,0 64,0 67,0	0 0 0	1 5 5	40
4	10,0	...	...	хранение

Таблица 3. Формат «Real-time»

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

№ блока	Температура, °С	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 4. Формат «Real-time»

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				
		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

**ВНИМАНИЕ!** При использовании других амплификаторов, свяжитесь с представителем компании для уточнения программы амплификации.

**Примечание.** При работе с наборами в формате «FLASH» 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 2–8°C в течение 1 месяца в тёмном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (18–25°C), для чего за 1 ч 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).

### **8.2.** Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов ДТ-322, 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 ДТ-322, ДТ-96).

### **8.3.** Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующего амплификатора iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

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).

### **8.4.** Регистрация результатов амплификации с использованием электрофореза

8.4.1. 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 ёмкости с водопроводной водой.

8.4.2. 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 (18–25°C) в течение 1 недели

или при температуре 2–8°C в течение 1 мес.

8.4.3. 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!

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

8.4.5. 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).

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

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

8.4.8. 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. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ**

**9.1.** Учёт результатов реакции с помощью ПЦР-детектора или детектирующего амплификатора

9.1.1. Учёт 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 Б (специфический продукт):

- программа ПЦР-детектора фиксирует положительный

результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учёт не принимается.

- детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции для специфического продукта. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учёт не принимается.

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

- 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 Б и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца (ПЦР-детектор);
- отсутствие 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 (наличие ДНК вируса гепатита Б) попадает в зону неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учёт 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.

## **9.2. Учёт 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 Б размером 295 п.н. Наличие или отсутствие полосы внутреннего контрольного образца в этом случае в учёт 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 Б, должны отсутствовать, а полоса внутреннего контрольного образца (фрагмент ДНК размером 560 п.н.) должна быть отчетливо видна.

9.2.3. В случае отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей фрагменту генома вируса гепатита Б размером 295 п.н., и отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контрольному образцу (фрагмент ДНК размером 560 п.н.), результат считают недостоверным. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.1.4).

9.2.4. В случае наличия полосы, соответствующей фрагменту ДНК вируса гепатита Б 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.

## Интерпретация результатов

Образец	Специфический продукт	Внутренний контрольный образец (ВК)	Интерпретация
Образец плазмы	+	не учитывать	Обнаружена ДНК HBV
	-	+	Не обнаружена ДНК HBV
	-	-	Недостовверный результат
Отрицательный контрольный образец	-	+	Отрицательный
Положительный контрольный образец	+	-	Положительный

**10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

- 10.1.** Срок годности набора: формат «FLASH» – 6 месяцев с даты изготовления. Форматы «Форез» и «Real-time» – 9 месяцев с даты изготовления.
- 10.2.** Комплекты 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 ПЦР-буфера, минерального масла и положительного контрольного образца при температуре 2–8°C. Допускается многократное размораживание ПЦР-буфера и минерального масла.
- 10.3.** Комплект реагентов для выделения НК, комплект реагентов для детекции ДНК, пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации следует хранить при температуре 2–8°C в течение всего срока годности набора.
- 10.4.** Смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой следует хранить при температуре 18–25°C не более 1 ч.
- 10.5.** Раствор буфера для электрофореза можно хранить при комнатной температуре (18–25°C) не более 7 дней или при температуре 2–8°C не более 1 мес.
- 10.6.** Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

- 10.7.** Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 10.8.** Предприятие–изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортировки, хранения и применения, установленных техническими условиями.

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

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6

Тел./факс + 7 (495) 980-45-55

E-mail: [help@dna-technology.ru](mailto:help@dna-technology.ru)

[www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru)

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

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

Номер 136-6  
18.08.11







ДНК-Технология  
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6  
Тел./факс (495) 980-45-55  
E-mail: [help@dna-technology.ru](mailto:help@dna-technology.ru)  
[www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru)