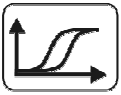
ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ
научно–производственная фирма



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

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 23 октября 2008 года №8427-Пр/08

ИНСТРУКЦИЯ

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

ВГБ-ГЕН

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВГБ-ГЕН предназначен для выявления ДНК вируса гепатита Б (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 Б *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, использующиеся для детекции продуктов амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет раздельно регистрировать результаты амплификации

ДНК вируса гепатита Б 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°С.

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 2б (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 раздельных 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 включенным 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°С;
- микроцентрифуга/вортекс со скоростью вращения 1000–3000 об/мин;
- насос с колбой-ловушкой для удаления надосадочных 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 объёмом 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°С.

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 объёмом 1,5 мл.

Полученная плазма готова для выделения НК.

При необходимости хранить полученную плазму при температуре минус 20°С 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°С 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°С 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°С в течение 5 мин.

7.1.17. Добавить к осадку 25 мкл буфера для растворения и прогреть пробирки при 65°С 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°С в течение одного месяца или при минус 70°С в течение одного года.

7.2. 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 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 Taq-полимеразой:

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

где N+1 – количество анализируемых образцов с учётом «К-»и «К+» (N) с запасом на 1 образец.

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

Смесь можно хранить при комнатной температуре (18–25°С) 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°С в течение 1 месяца или при температуре минус 20°С 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, °С	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, °С	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°С в течение 1 месяца в тёмном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (18–25°С), 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°С) в течение 1 недели

или при температуре 2–8°С 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.

Таблица 5

Интерпретация результатов

Образец	Специфический продукт	Внутренний контрольный образец (ВК)	Интерпретация
Образец плазмы	+	не учитывать	Обнаружена ДНК HBV
	-	+	Не обнаружена ДНК HBV
	-	-	Недостоверный 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°С в течение всего срока годности. Допускается хранение ПЦР-буфера, минерального масла и положительного контрольного образца при температуре 2–8°С. 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°С в течение всего срока годности набора.

10.4. Смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой следует хранить при температуре 18–25°С не более 1 ч.

10.5. Раствор буфера для электрофореза можно хранить при комнатной температуре (18–25°С) не более 7 дней или при температуре 2–8°С 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
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
www.dna-technology.ru