



УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО НПФ «Литех»

Наумов А.Ю.

2011.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения ДНК вируса гепатита В (HBV)
в сыворотке или плазме крови
методом полимеразной цепной реакции

(БИОТИТР-В)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов БИОТИТР-В предназначен для количественного определения ДНК вируса гепатита В (HBV) в сыворотке или плазме крови человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах. Набор реагентов также может быть использован с целью качественного определения вируса гепатита В.

Набор предназначен для применения только *in vitro*.

1.2. Набор реагентов БИОТИТР-В может быть использован в клинической медицине для определения ДНК вируса гепатита В с целью выявления носительства вируса гепатита В и оценки эффективности проводимой терапии.

1.3. Набор выпускается в двух форматах:

формат «Количественный» предназначен для проведения анализа 95 клинических образцов, 5 проб отрицательного контрольного образца выделения, 5 проб отрицательного контрольного образца ПЦР, 4-х стандартных калибровочных образцов ДНК вируса гепатита В (по 5 проб каждого) – всего 125 тестов.

формат «Качественный» предназначен для проведения анализа 95 клинических образцов, 5 проб отрицательного контрольного образца выделения, 5 проб отрицательного контрольного образца ПЦР, 5 проб положительного контрольного образца, (всего 110 тестов).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

2.1.1. Набор реагентов БИОТИТР-В основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК возбудителя путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Анализ с использованием метода ПЦР включает 3 этапа:

1. Пробоподготовка (выделение ДНК).
2. Постановка реакции амплификации.
3. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации.

Флуоресцентная детекция продуктов амплификации позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации ДНК-фрагмента в процессе реакции. Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе за счет специфической гибридизации ампликонов с олигонуклеотидным зондом, несущим флуоресцентную метку. В ходе последующей полимеразной реакции происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию. Программное обеспечение, прилагаемое к амплификатору, позволяет проводить корректную обработку данных для выявления ДНК вируса гепатита В.

Флуоресцентная детекция не требует открывания пробирок после проведения ПЦР и извлечения из них продуктов реакции, что значительно снижает опасность контаминации помещения и реагентов ампликонами.

Концентрацию ДНК вируса гепатита В в анализируемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости уровня флуоресценции от содержания ДНК вируса гепатита В в калибровочных пробах.

2.2. Состав набора

В состав набора реагентов входят два комплекта:

2.2.1. Комплект для пробоподготовки (см табл. 1).

Таблица 1.

Состав	Комплектация
1. Реагент БИОТИТР-В ЭКСПРЕСС 3. Отрицательный контрольный образец выделения*	100 пробирок (по 200 мкл) 5 пробирок (по 200 мкл)

БИОТИТР-В ЭКСПРЕСС представляет собой готовый реагент для выделения ДНК вируса гепатита В из биопроб, расфасованный по 200 мкл в пробирки типа Эппендорф.

*Отрицательный контрольный образец выделения представляет собой пробу на основе сыворотки крови крупного рогатого скота, не несущую фрагменты последовательности ДНК вируса гепатита В.

2.2.2. Комплект реагентов для проведения ПЦР-амплификации.

Данные комплекты выпускаются в двух различных форматах - качественном и количественном.

Состав комплектов представлен в таблице 2.

Таблица 2

Формат Маркировка	Состав	Комплектация
Формат Качественный	1. Реакционная смесь* 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Внутренний контрольный образец** 5. Положительный контрольный образец*** 6. Отрицательный контрольный образец ПЦР	1 пробирка (575 мкл) 1 пробирка (50 мкл) 2 пробирки (по 2 мл) 1 пробирки (70 мкл) 1 пробирка (60 мкл) 1 пробирка (60 мкл)
Формат Количественный	1. Реакционная смесь* 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Внутренний контрольный образец 5. Отрицательный контрольный образец ПЦР 6. Калибровочная проба 10^4 копий ДНК/мл**** 7. Калибровочная проба 10^5 копий ДНК/мл**** 8. Калибровочная проба 10^6 копий ДНК/мл**** 9. Калибровочная проба 10^7 копий ДНК/мл****	1 пробирка (650 мкл) 1 пробирка (60 мкл) 3 пробирки (по 2 мл) 1 пробирки (70 мкл) 1 пробирка (60 мкл) 1 пробирка (60 мкл) 1 пробирка (60 мкл) 1 пробирка (60 мкл) 1 пробирка (60 мкл)

Комплект для проведения амплификации включает готовые к применению реагенты.

*В состав реакционной смеси входят:

- раствор дНТФ;
- праймеры для выявления специфического фрагмента ДНК вируса гепатита В;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды (2 зонда): зонд для специфического фрагмента содержит флуорофор FAM. зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX;

**Внутренний контрольный образец (ВКО) представляет собой рекомбинантную плазмиду, содержащую последовательности для специфических праймеров и зонда внутреннего контроля. ВКО позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию, и качество выделения ДНК.

***Положительный контрольный образец представляет собой защищенную неинфекционную ДНК в растворе ТЕ-буфера, несущую фрагменты последовательности вируса гепатита В (HBV) в концентрации 10^5 копий ДНК HBV /мл.

****Калибровочные пробы представляют собой защищенную неинфекционную ДНК в растворе ТЕ-буфера, несущую фрагменты последовательности вируса гепатита В (HBV); содержат известные количества ДНК (10^4 , 10^5 , 10^6 и 10^7 копий ДНК HBV /мл).

Комплект для проведения амплификации (по желанию клиента) может также представлять готовую к применению расфасованную по индивидуальным пробиркам амплификационную смесь (маркировка OneStep).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность анализа

С помощью набора БИОТИТР-В можно обнаружить 10^3 и более копий ДНК вируса гепатита В в мл сыворотки или плазмы крови.

3.2. Специфичность анализа

100% специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к наиболее консервативному участку генома (ген поверхностного антигена HBsAg) вируса гепатита В (HBV), а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарным участком ампликона (специфического продукта амплификации). Использование набора БИОТИТР-В позволяет выявлять только вирус гепатита В (HBV) и исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

3.3. Точность анализа

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» - соответствие измеренной концентрации ДНК HBV предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов разбавителя и калибровочной пробы с концентрацией 10^6 копий ДНК HBV/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.4. Линейность

Зависимость концентрации ДНК HBV в образцах, прошедших процедуру выделения, при разведении их разбавителем, имеет линейный характер в диапазоне концентраций $10^3 - 10^7$ копий ДНК HBV на мл и составляет $\pm 10\%$.

3.5. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения концентрации ДНК HBV в одном и том же образце сыворотки крови не превышает 8 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. Меры предосторожности - 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.).

4.4. При работе с анализируемым биоматериалом следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1-й этап – выделение ДНК из биопробы

- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл на 8000 – 12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- твердотельный термостат для пробирок вместимостью 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до $+ 99^{\circ}\text{C}$;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

2-й этап - проведение ПЦР-амплификации.

- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме «реального времени»;
- **бесцветные** одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

6. ПРОБОПОДГОТОВКА

6.1. Взятие, доставка и хранение клинического материала.

Для получения сыворотки венозную кровь в количестве 500 мкл собрать в полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл и дать крови свернуться. Пробирку центрифугировать 5 минут при 3000 об/мин, полученную сыворотку перенести в стерильную полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Сыворотку крови можно хранить при температуре -20°C не более 1 месяца.

Для получения плазмы венозную кровь в количестве 500 мкл собрать в стерильную полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл с 50 мкл 0,5 М раствора ЭДТА. Тщательно перемешать, пробирку центрифугировать 5 минут при 3000 об/мин, полученную плазму перенести в стерильную полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Плазму крови можно хранить при температуре -20°C не более 1 месяца.

6.2. Выделение ДНК.

6.2.1. Исследуемые образцы сыворотки или плазмы крови перемешать и осадить капли с крышек центрифугированием в течение 3-5 секунд при 2250 – 4000 g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+18-25°C) на микроцентрифуге-вортексе.

6.2.2. Промаркировать пробирки с реагентом БИОТИТР-В ЭКСПРЕСС (включая пробирку для отрицательного контрольного образца) и расположить их соответствующим образом в штативе.

6.2.3. Внести по 200 мкл исследуемых образцов сыворотки или плазмы крови в соответствующие пробирки.

6.2.4. Внести по 200 мкл отрицательного образца выделения из комплекта для пробоподготовки в соответствующие пробирки.

Во избежание контаминации образцов сыворотку или плазму крови следует переносить в пробирку с раствором, используя наконечники с фильтрами.

6.2.5. Пробирки закрыть и **тщательно** перемешать на микроцентрифуге-вортексе в течение 10 секунд.

6.2.6. Осадить капли с крышек пробирок центрифугированием в течение 3-5 секунд при 2250 – 4000 g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре на микроцентрифуге-вортексе.

6.2.7. Поместить пробирки в твердотельный термостат, предварительно прогретый до температуры +99°C, на 25 минут.

Для эффективной пробоподготовки необходимо убедиться, что твердотельный термостат поддерживает температуру не менее + 99°C.

6.2.8. Центрифугировать при комнатной температуре в течение 1 минуты при 12 000 об/мин.

6.2.9. Супернатант использовать для постановки реакции амплификации.

Полученный раствор ДНК подлежит хранению при температуре -20°C не более 1 месяца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Проведение ПЦР-амплификации.

7.1.1. Приготовить **бесцветные** пробирки соответствующие типу прибора (согласно инструкции к прибору). Маркировка пробирок не допускается!

7.1.2. За 20-30 минут до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирки с Taq-полимеразой в ледяную баню). Пробирки с полностью размороженным содержимым тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

7.1.3. Из компонентов набора приготовить смесь реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу (табл. 3).

Таблица 3

Компонент набора	Объем в мкл
Разбавитель	35
Реакционная смесь	5
Taq-полимераза	0,4
Внутренний контрольный образец	0,5

ВНИМАНИЕ! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!

7.1.4. После добавления фермента, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием и осадить капли с крышки пробирки.

7.1.5. Внести в микропробирки по **40 мкл готовой реакционной смеси**. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

7.1.6. Добавить в пробирки с реакционной смесью по **10 мкл:**

- в пробирку отрицательного контрольного образца выделения – отрицательный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирку отрицательного контрольного образца ПЦР – отрицательный контрольный образец ПЦР из комплекта набора;
- в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- в пробирку положительного контрольного образца - положительный контрольный образец;
- в пробирки стандартных контрольных образцов (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7) для количественного определения – соответствующие калибровочные пробы.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

7.1.7. Пробирки центрифугировать в течение 3-5 секунд при 2250 – 4000 g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+18-25°C) на микроцентрифуге-вортексе для осаждения капель со стенок пробирок.

7.1.8. Поместить пробирки в амплификатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме «реального времени», прогретый до температуры + 94°C.

7.1.9. Амплификацию следует проводить по следующей программе:

1	+94°C	3 минуты	1 цикл
2	+94°C	15 секунд	42 цикла
3	+64°C	1 минута	
	+64°C	15 секунд*	

* измерение флуоресценции

Примечание. Приведенные программы отработаны для постановки реакции на примере прибора Bio-Rad iQ5. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю набора реагентов БИОТИТР-В.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Детекция продуктов амплификации

При проведении ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации. По завершении реакции прибор выдает кривые накопления флуоресцентного сигнала.

9. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов для формата «качественный».

9.1.1. По завершении реакции следует экспортировать данные, полученные управляющей программой, и далее анализировать их в программе, предназначенной для анализа результатов.

Пороговая линия для отсечки шума и анализа, а также циклы выравнивания выбираются согласно таблице 4.

Таблица 4

	Канал	Флуорофор	Пороговая линия	Конечный цикл (КЦ)	Выравнивание по циклам
Внутренний контроль	F2	HEX	60	38	5-15
HBV	F1	FAM	100	42	5-15

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления фонового сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца означает, что пересечения кривой накопления с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим

значением конечного цикла. Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

9.1.2. Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5

	Ct FAM	Ct HEX	Результат
К+	<42	<38	Специфическая реакция прошла.
К- ПЦР	НЗ	<38	Контаминация на стадии ПЦР отсутствует.
	<42	<38	Специфическая контаминация на стадии ПЦР. ТРЕБУЕТСЯ принятие антиконтаминационных мер и повтор анализа.
К- Выделения	<42	<38	Специфическая контаминация на стадии выделения и/или ПЦР.
	НЗ	<38	Специфическая контаминация отсутствует.
Анализируемый образец	<42	<38	ПРИСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	НЗ	<38	ОТСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	НЗ	НЗ или >38	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК ТРЕБУЕТСЯ повтор выделения и анализа данного образца.

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct FAM – цикл пересечения кривой накопления специфического (флуорофор FAM) флуоресцентного сигнала образца с пороговой линией;

Ct HEX – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор HEX) с пороговой линией;

НЗ – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано.

Примечание. Приведенные характеристики конечного цикла и пороговые значения представлены на примере прибора Bio-Rad iQ5. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов БИОТИТР-В.

9.2. Анализ результатов для формата «количественный».

9.2.1. При проведении анализа с использованием наборов формата «количественный» необходимо ввести значения стандартных контрольных образцов (калибровочных проб) в программе, предназначенной для анализа результатов. С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически определит циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией и рассчитает концентрации анализируемых образцов и контролей (см. рис.1). Концентрация ДНК HBV выражается в копиях/мл. Фактор пересчета между копиями ДНК HBV и Международными единицами HBV составляет 13,7, в соответствии со вторым Международным стандартом WHO ДНК HBV для тестов, основанных на определении нуклеиновых кислот (NIBSC 97/750).

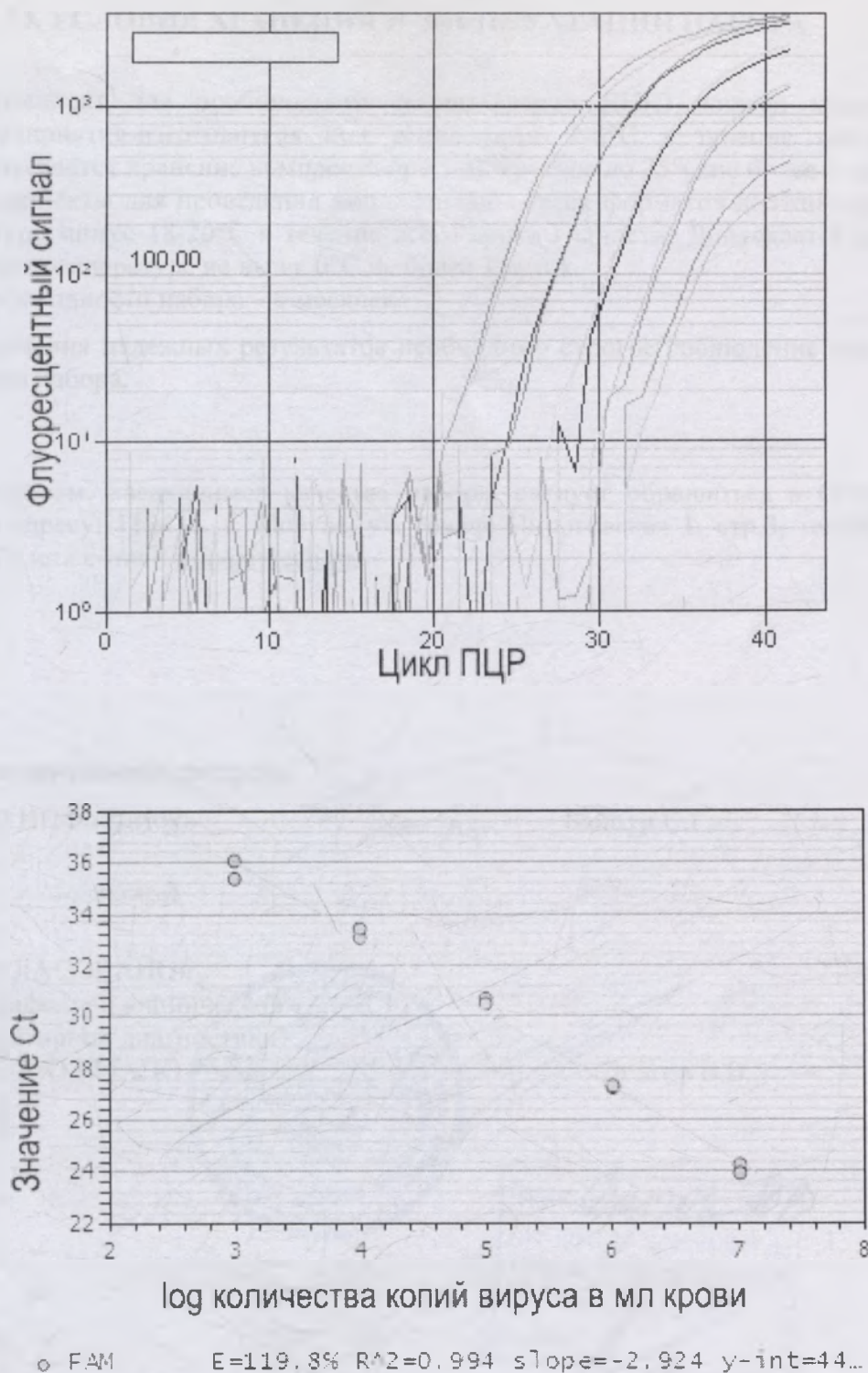


Рис 1. Кривые накопления флуоресцентного сигнала для калибровочных проб и построенный по ним калибровочный график.

Численное выражение концентрации показывает, что рассчитанное значение результата укладывается в линейный диапазон определения, составляющий $10^3 - 10^7$ копий/мл. Результаты, не укладывающиеся в данный диапазон, обладают высокой вариабельностью и не могут рассматриваться как точные.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Комплект для пробоподготовки (выделение ДНК) должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение комплекта при температуре до 25°C не более 1 суток.

10.2. Комплекты для проведения амплификации всех форматов должны храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Допускается хранение комплектов при температуре не выше 0°C не более 1 суток.

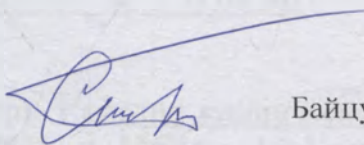
10.3. Срок годности набора – 6 месяцев.

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

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО НПФ «ЛИТЕХ» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)589-14-03, или e-mail: info@lytech.ru.

Исполнительный директор

ООО НПФ «Литех»



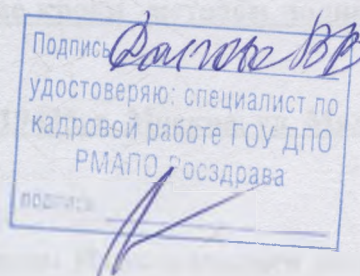
Байцур С.Г.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО Росздрава



Долгов В.В.



Прошито, проверено, скреплено печатью.
Количество листов 10
Директор  Наумов А.Ю.

