

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов для выявления ДНК вируса
гепатита В (HBV) методом PCR
«ROSSAmed HBV-DNA»

Назначение и характеристика

Набор реагентов «ROSSAmed HBV-DNA» предназначен для качественного выявления ДНК вируса гепатита В, методом ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени». Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из плазмы крови. Комплектация набора «ROSSAmed HBV-DNA» рассчитана на проведение 100 реакций, включая контрольные образцы.

Таблица 1. Состав набора реагентов

Состав	Комплектация
1. ПЦР-реагент	1 пробирка - 1,0 мл
2. Праймер микс	1 пробирка - 1,0 мл
3. ПКО	1 пробирка - 0,2 мл
4. ОКО	1 пробирка - 1,0 мл
5. ВКО	1 пробирка - 1,0мл

Меры предосторожности

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

Подготовку и проведение исследования с использованием набора реагентов следует выполнять в ПЦР-боксах.

Дозаторы, используемые при работе с набором, должны быть соответствующим образом проверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение одного часа.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

При использовании набора в диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями.

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортировки и хранения;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечении срока годности набора.

Оборудование и материалы

- амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»;
- ламинарный бокс/ПЦР-бокс;
- центрифуга/вортекс типа MICROSPIN FV-2400;
- набор дозаторов переменного объема (до 10 мкл, до 200 мкл, до 1000 мкл);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема (10 мкл, 200 мкл, 1000 мкл);
- пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл;
- оптические пробирки или стрипы для ПЦР 0.2 мл;
- соответствующие штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

Проведение анализа

Выделение ДНК.

Выделение производится в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя набора для выделения ДНК.

! Добавить 10 мкл ВКО в каждую пробирку на этапе выделения в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя набора для выделения.

Подготовка ПЦР-смеси

1. Разморозить все реагенты при комнатной температуре, перемешать на вортексе и осадить капли со стенок и крышек пробирок с помощью кратковременного центрифугирования.

2. Приготовить и промаркировать необходимое количество пробирок по 0,2 мл. В каждую постановку амплификации, помимо исследуемых образцов, должны входить контрольные образцы: отрицательный контроль ПЦР (ОКО), положительный контроль ПЦР (ПКО), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

3. В пробирке объемом 1,5 мл приготовить «Мастер-микс» по формуле:

10 × (N+1) мкл ПЦР-реагента и 10 × (N+1) мкл Праймер микс;

где N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

Перемешать «Мастер микс» на вортексе и осадить капли со стенок и крышек пробирок с помощью кратковременного центрифугирования.

4. Внести по **20 мкл Мастер-микса** в подготовленные пробирки для проведения ПЦР.

5. Добавить по **30 мкл ДНК** исследуемых образцов, в пробирку К- внести **30 мкл ОКО**, в пробирку К+ **30 мкл ПКО**, в пробирку ОКЭ внести **30 мкл ОКЭ**.

6. Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок, удалить кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

1. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.

2. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2. Параметры амплификации

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Элонгация/Детекция по каналам FAM, HEX	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	

3. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать расположение пробирок в амплификаторе, запустить амплификацию и сохранить файл с результатами эксперимента.

Анализ результатов

! Результат амплификации **внутреннего контрольного образца** регистрируется по каналу **FAM**, результат амплификации **ДНК возбудителя** регистрируется по каналу флуоресценции **HEX**.

1. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору, установить «Пороговый Метод (Ct)», при необходимости установить значение параметра пороговой линии, выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке - переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

2. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	Значение «Ct» по каналу «FAM» (Внутренний контрольный образец)	Значение «Ct» по каналу «HEX» (ДНК возбудителя)
ОКЭ*	+	-
К-**	-	-
К+	+	+

*В случае несоответствия контрольной точки ОКЭ необходимо провести повторное исследование всех положительных образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

**В случае несоответствия контрольных точек К- необходимо провести повторное исследование всех образцов, начиная с этапа амплификации.

3. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Интерпретация результатов анализа

Результат образца	Значение «Ct» по каналу «FAM» (Внутренний контрольный образец)	Значение «Ct» по каналу «HEX» (ДНК возбудителя)
Положительный	+/-	+
Отрицательный	+	-
Не валидный*	-	-

«-» - значения «Ct» отсутствуют, график амплификации не пересекает пороговую линию;

«+» - наличие значения «Ct», график амплификации пересекает пороговую линию;

«+/-» - значение «Ct» для данного канала не анализируется;

*В случае не валидного результата требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа взятия биологического материала.

Проблемы при работе и методы их устранения.

Проблема	Возможная причина	Варианты решения
Нет сигнала по всем каналам	Использование неподходящих расходных материалов	Используйте оптические пробирки для постановки ПЦР с прозрачными крышками, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора, либо адаптированные для используемого прибора
	ПЦР ингибирование	Разведите образец в 5 раз в воде, повторите анализ
		Повторить ПЦР-анализ, начиная с этапа взятия биологического материала.
Нет сигнала в К+	Некорректное приготовление ПЦР- смеси	Аккуратно приготовьте новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	Установите параметры амплификации в соответствии с таблицей 2.
	Некорректные условия хранения наборов	Используйте наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала по каналу «HEX» в К- и/или ОКЭ	Контаминация	Проведите деконтаминационные процедуры

Транспортировка

Транспортировка наборов реагентов осуществляется при температуре от минус 24°С до минус 16°С. Допускается транспортировка любым видом транспорта при температуре от 4°С до 8°С, не более 48 часов, в условиях, обеспечивающих сохранность набора, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

Хранение

Компоненты набора реагентов хранят в упаковке изготовителя при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. Допускается заморозка/оттаивание компонентов не более 10 раз. Срок годности набора реагентов - 12 месяцев с даты изготовления, при соблюдении условий хранения набора реагентов.

Производитель

ООО «ROSSA» Узбекистан, город Нурафшан, посёлок Дегантепа, улица Рохат дом 93 Тел.: +99870 202 60 60, e-mail: info@rossa.uz

Служба поддержки клиентов: +99899 353 37 87