

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2025/26077 от 21 августа 2025 года**В данном вкладыше приведена информация для набора реагентов HBV в фасовке S.**
Перед началом работы изучите инструкцию.

Набор реагентов для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) методом ПЦР в режиме реального времени HBV

REF R1-P615-S3/9 (Фасовка S, стрипы)
R1-P615-23/9 (Фасовка S, пробирки)

Информация о наборе реагентов

Назначение:

Набор реагентов предназначен для качественного определения ДНК вируса гепатита В в биологическом материале человека (плазма крови, сыворотка крови) методом ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК:

Наборы реагентов для выделения НК ПРОБА-НК-УЛЬТРА, ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА, ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ (ООО «ДНК-Технология ТС»).

Специализированное оборудование:Детектирующие амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированные в установленном порядке в РФ, например, детектирующие амплификаторы «ДТпрайм»¹, «ДТлайт»² (ООО «НПО ДНК-Технология»), CFX96 (Био-Рад Лабораториз, Инк), Applied Biosystems QuantStudio 5 («Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.»).**Количество анализируемых образцов:**

96 определений (не более 6 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

Состав набора реагентов:

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок	по 15 мкл
ОТ-ПЦР-буфер "V"	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 810 мкл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
Внутренний контрольный образец ДНК-ВК "А" ³	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец ³	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов ⁴	12 шт.		

Т а б л и ц а 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex/Vic	Rox	Cy5	Cy5.5
–	ВК*	ДНК HBV	–	–
* – внутренний контрольный образец ДНК-ВК "А"				

¹ – модификация *М*² – модификация *С*³ – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+», «Внутренний контрольный образец ДНК-ВК "А"» указывается как «ДНК-ВК "А"»⁴ – входят в состав набора реагентов при расфасовке смеси для амплификации, запечатанной парафином, в стрипы

Проведение анализа

- 1 Выделение ДНК**

Для выделения ДНК HBV из плазмы/сыворотки крови валидированы наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот вирусов из крови ПРОБА-НК-УЛЬТРА, ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА и ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия.

Внутренний контрольный образец. В качестве внутреннего контрольного образца при выделении ДНК следует использовать **внутренний контрольный образец ДНК-ВК "А"** из набора реагентов HBV.

В случае выделения ДНК HBV с использованием набора реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА следует вносить ДНК-ВК "А" в объёме **10 мкл на образец**.

В случае выделения ДНК HBV с использованием наборов реагентов ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА и ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ следует вносить ДНК-ВК "А" в объёме **20 мкл на образец**.

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо провести через все этапы пробоподготовки **отрицательный контрольный образец** (отрицательный контрольный образец из состава набора реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА или ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА, разбавитель для контрольных материалов из состава набора реагентов ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ) в соответствии с инструкцией по применению используемого набора реагентов.
- 2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции**

ВНИМАНИЕ!

 1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирку со смесью для амплификации.
 2. При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы», следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

2.1 Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого неизвестного образца, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

Пример:

Необходимо проанализировать 6 неизвестных образцов. Для этого нужно промаркировать 6 пробирок для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 8.

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 6 постановок при условии вариабельного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

2.2 Встряхните пробирку с ОТ-ПЦР-буфером "V" и ферментом Taq/RT на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

2.3 Приготовьте смесь ОТ-ПЦР-буфера "V" с ферментом Taq/RT. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

 - 15 × (N+1) мкл ОТ-ПЦР-буфера "V",
 - 0,5 × (N+1) мкл фермента Taq/RT,

где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К-» и «К+».

Смесь можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного часа.

Пример:

Необходимо проанализировать 6 неизвестных образцов. Промаркированных пробирок – 8. Нужно приготовить смесь ОТ-ПЦР-буфера "V" с ферментом Taq/RT для 9 (8+1) пробирок, т.е. 135 мкл ОТ-ПЦР-буфера "V" + 4,5 мкл фермента Taq/RT.

ВНИМАНИЕ! При взятии фермента Taq/RT необходимо погружать наконечник не более чем на 1,0 мм и соблюдать правила дозирования вязких жидкостей. Тщательно смыть остатки фермента Taq/RT с наконечника пипетированием не менее 5 раз.

2.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ОТ-ПЦР-буфера "V" и фермента Taq/RT на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

2.5 Добавьте во все промаркированные пробирки (включая «К-» и «К+»), не повреждая слой парафина, по 15 мкл смеси ОТ-ПЦР-буфера "V" с ферментом Taq/RT. Плотно прикройте пробирки/стрипы крышками.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ОТ-ПЦР-буфера "V" и фермента Taq/RT в пробирки со смесью для амплификации необходимо сразу же выполнить 2.6 – 2.11.

2.6 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

 1. Для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирки с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкциях по применению наборов реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА, ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА и ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ.
 2. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Необходимо закрывать пробирки/стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

2.7 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 20 мкл полученного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К-», «К+», ДНК не вносится.

2.8 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 20 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

- 2.9** Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 20 мкл положительного контрольного образца.
- 2.10** Центрифугируйте пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
- 2.11** Установите все пробирки/стрипы в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР (2.12, 2.13).
- 2.12** **Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:**
Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹ Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 2.
- 2.13** **Для детектирующих амплификаторов CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5:**
Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 50 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 3, 4 соответственно.

Т а б л и ц а 2 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	47	15	0	1		Цикл
2	95	5	0	1		Цикл
3	95	0	10	50		Цикл
	59	0	20		√	
4	25 ²	...	...	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

Т а б л и ц а 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96

№ блока (Step)	Температура, °С	Время, мин:сек	Количество циклов (повторов)
1	47	15:00	1
2	95	5:00	1
3	95	0:10	50
4	59 √	0:20	

√ – режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Hex, Rox) при 59 °С

Т а б л и ц а 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов Applied Biosystems QuantStudio 5³

Стадия	№ шага	Температура, °С	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
Стадия удержания	1	47	15:00	1
	2	95	05:00	1
Стадия ПЦР	1	95	0:10	50
	2	59 √	0:25	

√ – сбор данных для необходимых флуорофоров (Vic (Hex), Rox) включён

- 3** **Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводятся автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов.
- Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 5. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.
- При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression) и исключить из анализа первые 5 циклов (Analyze Date from Cycle 5 to 50).
- При использовании амплификатора Applied Biosystems QuantStudio 5 данные амплификации могут быть получены различными методами, например, базовый порог (Ct) или относительный порог (Crt). Следовательно, эти точки могут иметь разные аббревиатуры (Ct, Crt), но обрабатываются в дальнейшем одинаково. В настройках относительного порога (Crt) начальный цикл Crt «5». Интерпретация результатов амплификации внутреннего контроля ДНК-ВК (Vic) в таблице 5 соответствует относительному порогу (Crt).
- При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5 необходимо проанализировать выбранные образцы и исключить из анализа лунки, сигнал в которых превышает фоновый сигнал прибора, но имеет линейный, а не S-образный характер.

¹ – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А инструкции по применению) или предоставляется производителем набора реагентов

² – допускается хранение при температуре 10 °С

³ – Тип эксперимента – Стандартная кривая. Допускается использовать быстрый режим запуска

Таблица 5 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции		Интерпретация результата
Rox (ДНК HBV) Cp/Cq/Crt	Hex/Vic (BK) Cp/Cq/Crt	
Неизвестные образцы		
Указан	Не учитывается	Обнаружена ДНК HBV
Не указан	≤35	Не обнаружена ДНК HBV
Не указан	>35 либо не указан	Недостоверный результат
Отрицательный контрольный образец		
Не указан	≤35	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец		
Указан	Не учитывается	Положительный результат Результаты постановки валидны

Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

Допускается транспортирование фермента Taq/RT в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С не более 5 суток.

Все компоненты набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в защищенном от света месте. Фермент Taq/RT следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Символы, используемые при маркировке набора реагентов

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Номер по каталогу
	Температурный диапазон		Изготовитель
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов		Не допускать воздействия солнечного света
	Использовать до		Нестерильно
	Код партии (серии)		Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Дата изготовления		