



Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2025/26078 от 21 августа 2025 года



В данном вкладыше приведена информация для набора реагентов HBV Количественный в фасовке S.
Перед началом работы изучите инструкцию.

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

REF Q3-P614-S3/9 (Фасовка S, стрипы)
Q3-P614-23/9 (Фасовка S, пробирки)

Информация о наборе реагентов

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

Количество анализируемых образцов: 96 определений (не более 6 постановок), включая анализ неизвестных образцов, калибровочных 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" ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец ²	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Калибровочный образец HBV-СТ1 (5×10 ^{^7} МЕ/мл)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	360 мкл
Калибровочный образец HBV-СТ2 (5×10 ^{^4} МЕ/мл)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	360 мкл
Крышки для стрипов ²	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 – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+», «Внутренний контрольный образец ДНК-ВК "А"» указывается как «ДНК-ВК "А"»

² – 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.

Калибровочные образцы HBV-СТ1 и HBV-СТ2 необходимо провести через этап выделения нуклеиновых кислот.

Каждая группа выделяемых образцов должна включать один отрицательный контрольный образец (К-), три калибровочных образца «СТ1», три калибровочных образца «СТ2».

Выделение ДНК HBV с использованием набора реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА

Перед проведением исследования необходимо разбавить калибровочные образцы HBV-СТ1 и HBV-СТ2 отрицательным контрольным образцом (из состава набора реагентов ПРОБА-НК-УЛЬТРА).

- При выделении ДНК HBV из 1000 мкл неизвестного образца необходимо внести в пробирки, промаркированные «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2», по 20 мкл соответствующего калибровочного образца и 980 мкл отрицательного контрольного образца.

- При выделении ДНК HBV из 500 мкл неизвестного образца необходимо внести в пробирки, промаркированные «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2», по 20 мкл соответствующего калибровочного образца и 480 мкл отрицательного контрольного образца.

- При выделении ДНК HBV из 250 мкл неизвестного образца необходимо внести в пробирки, промаркированные «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2», по 20 мкл соответствующего калибровочного образца и 230 мкл отрицательного контрольного образца.

В случае смешанной постановки (включающей одновременный анализ образцов, выделенных из 1000 мкл, 500 мкл и 250 мкл) следует проводить выделение калибровочных образцов и отрицательного контрольного образца из 1000 мкл.

Выделение ДНК HBV с использованием набора реагентов ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА

Перед проведением исследования необходимо разбавить калибровочные образцы HBV-СТ1 и HBV-СТ2 отрицательным контрольным образцом (из состава набора реагентов ПРОБА-МЧ-УЛЬТРА).

- При выделении ДНК HBV из 500 мкл неизвестного образца необходимо внести в пробирки, промаркированные «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2», по 20 мкл соответствующего калибровочного образца и 480 мкл отрицательного контрольного образца.

Выделение ДНК HBV с использованием набора реагентов ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ

Перед проведением исследования необходимо разбавить калибровочные образцы HBV-СТ1 и HBV-СТ2 разбавителем для контрольных материалов (из состава набора реагентов ПРОБА-МЧ-ЛАЙТ).

- При выделении ДНК HBV из 250 мкл неизвестного образца необходимо внести в пробирки, промаркированные «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2», по 20 мкл соответствующего калибровочного образца и 230 мкл разбавителя для контрольных материалов.

- При малом объёме исследуемого материала возможно проведение выделения ДНК HBV из 100 мкл неизвестного образца. В этом случае необходимо внести в пробирки, промаркированные «HBV-СТ1» и «HBV-СТ2», по 20 мкл соответствующего калибровочного образца и 80 мкл разбавителя для контрольных материалов.

В случае смешанной постановки (включающей одновременный анализ образцов, выделенных из 250 мкл и 100 мкл) следует проводить выделение калибровочных образцов и отрицательного контрольного образца из 250 мкл.

2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки 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, по три пробирки для калибровочного образца HBV-СТ1 (СТ1) и для калибровочного образца HBV-СТ2 (СТ2), по одной пробирке 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, три для «СТ1», три для «СТ2», одну для «К-» и одну для «К+». Общее количество пробирок – 14.

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 6 постановок при условии вариативного количества неизвестных образцов, 3 калибровочных образцов HBV-СТ1, 3 калибровочных образцов HBV-СТ2, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

2.2 Встряхните пробирки с ОТ-ПЦР-буфером "V" и ферментом Taq/RT на микроцентрифуге-вортке в течение 1–3 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке 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 «СТ1», «СТ2», «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 – 14. Нужно приготовить смесь ОТ-ПЦР-буфера "V" с ферментом Taq/RT для 15 (14+1) пробирок, т.е. 225 мкл ОТ-ПЦР-буфера "V" + 7,5 мкл фермента Taq/RT.

ВНИМАНИЕ! При взятии фермента Taq/RT необходимо погрузить 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-вortexе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вortexе 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. Неплотно 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 – 2.12.

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

ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК, калибровочных образцов и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирку 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 «СТ1», «СТ2», «К–» и «К+», препарат ДНК не вносится.

2.8 Внесите в пробирки, промаркированные «СТ1» и «СТ2» (3 шт. для каждого калибровочного образца), не повреждая слой парафина, по 20 мкл соответствующего калибровочного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

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

2.10 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 20 мкл положительного контрольного образца.

2.11 Центрифугируйте пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вortexе в течение 3–5 с.

2.12 Установите все пробирки/стрипы в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР (2.13, 2.14).

2.13 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, укажите соответствующие концентрации калибровочных образцов: для «СТ1» – $5,0 \times 10^7$, для «СТ2» – $5,0 \times 10^4$; 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.

2.14 Для детектирующих амплификаторов CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5:

Укажите соответствующие концентрации калибровочных образцов: для «СТ1» – $5,0 \times 10^7$, для «СТ2» – $5,0 \times 10^4$ и проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 50 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 3 и 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

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

Т а б л и ц а 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов Applied Biosystems QuantStudio 5¹

Стадия	№ шага	Температура, °C	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 отсутствии сервисного программного обеспечения вычисление концентрации ДНК HBV в образцах плазмы/сыворотки проводят по формуле (см. инструкцию по применению). При использовании детектирующего амплификатора 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 детектирующего 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-БК (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.

Т а б л и ц а 5 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции		Интерпретация результата		
Rox*, в диапазоне, расчётная концентрация МЕ/мл				Hex/Vic, Cp/Cq/Crt
Выделение из 250–1000 мкл	Выделение из 100 мкл	Выделение из 250–1000 мкл	Выделение из 100 мкл	
Неизвестные образцы				
2,5х10 ¹ – 1,0х10 ⁹	1,0х10 ² – 2,5х10 ⁹	Не учитывается	Положительный результат с указанием вирусной нагрузки в образце (МЕ/мл)	
Менее 25	Менее 100	Не учитывается	Положительный результат с указанием	
			«менее 25 МЕ/мл» (без указания точного значения!)	«менее 100 МЕ/мл» (без указания точного значения!)
Более 1,0х10 ⁹	Более 2,5х10 ⁹	Не учитывается	Положительный результат с указанием	
			«более 1,0х10 ⁹ МЕ/мл» (без указания точного значения!)	«более 2,5х10 ⁹ МЕ/мл» (без указания точного значения!)
Не указан		≤35	Отрицательный результат, не обнаружена ДНК HBV	
Не указан		>35 либо не указан	Недостоверный результат	
Отрицательный контрольный образец				
Не указан		≤35	Отрицательный результат (концентрация не указана) Результаты постановки валидны	
Положительный контрольный образец				
2,0х10 ⁴ –2,0х10 ^{5**}		Не учитывается	Положительный результат с указанием концентрации ДНК в образце (МЕ/мл). Результаты постановки валидны	

* – линейный диапазон измерения зависит от объёма выделения образца

** – если в положительном контрольном образце определяемая концентрация выходит за рамки диапазона 2,0х10⁴ – 2,0х10⁵ МЕ/мл, необходимо повторить исследование

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 °C до 25 °C не более 5 суток. Допускается транспортирование фермента Taq/RT в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °C не более 5 суток. Все компоненты набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в защищённом от света месте. Фермент Taq/RT следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °C до минус 18 °C 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. Номер 753 2025-08-27

¹ – тип эксперимента – Стандартная кривая. Допускается использовать быстрый режим запуска