

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления провирусной ДНК
вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции
в режиме реального времени
«РеалБест ДНК ВИЧ» (ЦК)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК ВИЧ» (ЦК) предназначен для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. Набор выявляет генетические варианты ВИЧ-1 группы М (включая субтипы А и В). Материалом для исследования являются образцы цельной крови человека.

Набор предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма «Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма «Qiagen», Германия), так и планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Набор быть применен в клинической практике для анализа образцов цельной крови.

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные. Обеспечивает возможность проведения до 8 независимых процедур выделения по 6 образцов в каждой.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на выделении нуклеиновых кислот из пробы и проведении реакции амплификации выбранного фрагмента ДНК с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

Комплект реагентов для выделения предназначен для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов цельной крови.

Принцип ПЦР-анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

В анализируемых образцах дополнительно оценивается содержание ДНК гена HMBS человека с целью валидации качества образца.

2.2. Состав набора:

Комплект реагентов для обработки клинических проб и выделения ДНК

- раствор для гемолиза – 2 флакона по 14 мл;
- лизирующий раствор – 8 флаконов по 4 мл;
- осадитель НК – 4 флакона по 12 мл;
- раствор для отмывки №1 – 4 флакона по 8 мл;
- раствор для отмывки №2 – 4 флакона по 5 мл;
- элюирующий раствор – 4 флакона по 3 мл;
- сорбент (суспензия магнитных частиц) – 1 флакон, 1 мл.

Комплект контрольных образцов

- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 флакон, 4 мл;
- положительный контрольный образец (ПКО), лиофилизированный – 1 флакон;
- отрицательный контрольный образец (ОКО) – 2 флакона по 2 мл.

Комплект реагентов для проведения ПЦР

- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок.

Принадлежности:

- закручивающаяся пластиковая крышка для флакона с ПКО – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК ВИЧ-1 набором «РеалБест ДНК ВИЧ» (ЦК) определяется по четырем образцам с концентрацией ДНК ВИЧ 25 копий в объеме выделяемой пробы, приготовленным из образца №2 СОП ДНК ВИЧ-1 (ЦК) (рег. № 05-2-601), как

процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК ВИЧ-1 набором «РеалБест ДНК ВИЧ» (ЦК) определяется по стандартному образцу предприятия СОП ДНК ВИЧ (ЦК) (образец №1) (рег. № 05-2-601), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные и составляет 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1): клинические испытания, проведенные на 240 положительных образцах цельной крови и сухих пятен крови от 120 ВИЧ-инфицированных пациентов, показали 100 % чувствительность (интервал 97,5 % - 100 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1): клинические испытания, проведенные на 188 отрицательных образцах цельной крови и сухих пятен крови от 94 условно здоровых доноров, показали 100 % специфичность (интервал 96,9 % - 100 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР/ОТ-ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма «Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма «Qiagen», Германия) или планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», АО «Ламинарные системы»);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма «Eppendorf», Германия);

– дозаторы механические одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма Biohit, Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare, Германия»);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (например, фирма FinnTip, Финляндия);

– одноразовые полипропиленовые пробирки на 2 мл (например, фирма «SSI», США);

– магнитный штатив для выделения нуклеиновых кислот (АО «Вектор-Бест»);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма Хеликон, Россия);

- отсасыватель медицинский (например, В-40, «ВИСМА-ПЛАНАР», республика Беларусь);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ, или аналогичный);

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Образцы цельной крови забираются в вакуумную пробирку с ЭДТА или с цитратом натрия. После забора крови содержимое вакутейнера тщательно перемешать переворачиванием.

Внимание. Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной крови.

Транспортировать и хранить образцы следует:

при (18–25) °С не более 2 часов;

при (2–8) °С не более 1 недели;

при минус (18–60) °С не более 1 месяца.

Повторное замораживание-оттаивание цельной крови недопустимо!

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку (кроме упаковки с ГРС!) и выдержать анализируемые образцы и компоненты набора при температуре (18–25) °С в течение 30 минут.

6.2.2. Во флакон с ПКО добавить 1 мл РВК, аккуратно перемешать, выдержать 15 минут при комнатной температуре, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения хранить при температуре (2–8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 100 мкл при температуре минус (18–24) °С не более 3 месяцев.

6.2.3. ОКО готов к применению.

После вскрытия флакона хранить при температуре (2–8) °С не более 1 месяца.

6.2.4. Перед началом работы прогреть лизирующий раствор при (50–60) °С до растворения осадка, перемешать. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом до состояния гомогенной суспензии и во флакон с лизирующим раствором добавить 80 мкл суспензии сорбента. Тщательно перемешать.

7. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОПРОБ

7.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объемом 2 мл (по количеству анализируемых образцов, включая контрольные образцы). Установить их в штатив.

7.2. Для отрицательного контроля в пробирку (маркированную «ОКО») внести 100 мкл ОКО.

7.3. Для положительного контроля в пробирку (маркированную «ПКО») внести 70 мкл ОКО и 30 мкл ПКО.

7.4. В каждую пробирку (кроме ПКО и ОКО) внести по **500 мкл раствора для гемолиза**.

Внимание! Раствор для гемолиза после первого вскрытия флаконов хранить при температуре (2–8) °С не более 1 месяца.

7.5. Анализируемые образцы цельной крови перемешать до гомогенного состояния путём переворачивания вакуумных пробирок (*не вортиксировать!*).

7.6. В каждую пробирку с раствором для гемолиза дозатором с отдельными наконечниками внести по **250 мкл анализируемых образцов цельной крови** в соответствии с маркировкой пробирок.

Внимание! В том случае, когда объём образца является недостаточным, возможно использовать объёмы 200, 150, 100 или 50 мкл.

7.7. Пробирки плотно закрыть крышками и перемешать содержимое пробирок переворачиванием (*не вортиксировать!*).

7.8. Центрифугировать при 7000 об/мин в течение 3 минут.

7.9. Используя отдельный наконечник для каждого образца (кроме ПКО И ОКО), максимально полно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.10. В каждую пробирку, не задевая стенок, внести по 300 мкл лизирующего раствора с сорбентом. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 секунд. Выдержать в термошейкере в течение 5 минут при 65°С с частотой вращения 1300 об/мин. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

7.11. В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести по 400 мкл осадителя НК.

7.12. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 секунд. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 5 минут при температуре (18-25)°С.

7.13. Используя отдельный наконечник для каждого образца, максимально полно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.14. В каждую пробирку к осадку добавить 500 мкл раствора для отмывки № 1. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 секунд. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 2 минут на микроцентрифуге.

7.15. Используя отдельный наконечник для каждого образца, максимально полно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.16. В каждую пробирку к осадку добавить по 300 мкл раствора для отмывки № 2. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 секунд. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 2 минут на микроцентрифуге.

7.17. Используя отдельный наконечник для каждого образца, максимально полно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.18. Высушить осадки в открытых пробирках в течение 2-3 минут при температуре (18-25) °С.

7.19. В каждую пробирку к осадку добавить 200 мкл элюирующего раствора. Тщательно перемешать на вортексе, ресуспендируя магнитный осадок. Инкубировать в термошейкере в течение 5 минут при 65 °С с частотой вращения 1300 об/мин. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин в течение 1 минуты. Пробы готовы к постановке ПЦР

Внимание! Выделенная ДНК хранится при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Пробирки с подготовленными пробами установить в магнитный штатив.

8.2. Вскрыть упаковку с ГРС и отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2-8)°С составляет 3 месяца.

8.3. Пробирки с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! При использовании амплификатора «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q» надписи следует располагать на крышке пробирок. При использовании амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» надписи следует располагать на боковой части пробирок.

8.4. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК (из пробирок, установленных в магнитный штатив). Не захватывать осадок! Плотно закрыть пробирки крышками.

8.5. Поместить пробирки в амплификатор.

8.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

– для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);

– для приборов «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q»:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 40 секунд);

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °C.

8.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК HMBS и ДНК ВИЧ-1:

«FAM» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Green». (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК HMBS;

«ROX» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Orange» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК ВИЧ-1.

8.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

8.9. Запустить программу и провести ПЦР с флуоресцентной регистрацией результатов в режиме реального времени.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Условия анализа и учёта результатов.

9.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК гена HMBS в канале «FAM/Green» и определять значение порогового цикла Ct HMBS.

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВИЧ-1 в канале «ROX/Orange» и определять значение порогового цикла Ct ПКО;

9.1.2. В ОКО не должно фиксироваться нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX» («Orange»), а также нарастание сигнала амплификации ДНК гена HMBS человека по каналу «FAM» («Green»).

Если для ОКО значение Ct по каналу «FAM» («Green») меньше или равно 25 или по каналу «ROX» («Orange») меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (п. 9.2.3.).

9.1.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК гена HMBS (канал «FAM/Green») и определять Ct HMBS.

9.2. Учёт результатов.

9.2.1. Анализируемый образец считается положительным, то есть содержащим ДНК ВИЧ-1, если для этого образца значение Ct в канале «ROX/Orange» меньше или равно 40.

9.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным, то есть не содержащим ДНК ВИЧ-1, если для этого образца значение Ct в канале «ROX/Orange» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t HMBS больше 25 или не определяется, то результат не подлежит учёту как отрицательный. Необходим повторный забор материала и повторный анализ данного образца.

9.2.3. В случае контаминации ДНК ВИЧ-1 ($C_{t_{\text{ROX}} \text{ OKO}} \leq 40$) все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

В случае контаминации ДНК гена HMBS ($C_{t_{\text{FAM}} \text{ OKO}} \leq 25$) все отрицательные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен отрицательный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал положительный результат, следует учитывать как положительные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК ВИЧ» (ЦК), следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
АО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Зам. директора по научной работе ГБУЗ МО
«Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского»
д.м.н., профессор



А.В. Молочков

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 10
листов. Директор по технологии и
качеству АО "Вектор-Бест"

28 " 04 " 2017 г. Мясной А.В.



Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.
Руководитель лабораторного отдела ГБУЗ МО
МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

28 " 04 " 2017 г. Кудрявцева Е.Н.



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления провирусной ДНК
вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции
в режиме реального времени
«РеалБест ДНК ВИЧ» (СП)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК ВИЧ» (СП) предназначен для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. Набор выявляет генетические варианты ВИЧ-1 группы М (включая субтипы А и В). Материалом для исследования являются образцы сухих пятен крови.

Набор предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма «Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма «Qiagen», Германия), так и планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Набор может быть применен в клинической практике для анализа образцов сухих пятен крови.

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные. Обеспечивает возможность проведения до 8 независимых процедур выделения по 6 образцов в каждой.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на выделении нуклеиновых кислот из пробы и проведении реакции амплификации выбранного фрагмента ДНК с детекцией продуктов ПЦР в режиме

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

реального времени.

Комплект реагентов для выделения предназначен для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов сухих пятен крови.

Принцип ПЦР-анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

В анализируемых образцах дополнительно оценивается содержание ДНК гена HMBS человека с целью валидации качества образца.

2.2. Состав набора:

Комплект реагентов для обработки клинических проб и выделения ДНК

- лизирующий раствор – 8 флаконов по 7 мл;
- осадитель НК – 4 флакона по 12 мл;
- раствор для отмывки №1 – 4 флакона по 8 мл;
- раствор для отмывки №2 – 4 флакона по 5 мл;
- элюирующий раствор – 4 флакона по 3 мл;
- сорбент (суспензия магнитных частиц) – 1 флакон, 1 мл.

Комплект контрольных образцов

- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 флакон, 4 мл;
- положительный контрольный образец (ПКО), лиофилизированный – 1 флакон;
- отрицательный контрольный образец (ОКО) – 2 флакона по 2 мл.

Комплект реагентов для проведения ПЦР

- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок.

Принадлежности:

- закручивающаяся пластиковая крышка для флакона с ПКО – 1 шт.;
- бумажные карточки для сухих пятен крови – 48 шт.;
- пакеты для хранения и транспортировки образцов – 48 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК ВИЧ-1 набором «РеалБест ДНК ВИЧ» (СП) определяется по четырем образцам с концентрацией ДНК ВИЧ 50 копий ДНК ВИЧ в сухом пятне крови из образца №2 СОП ДНК ВИЧ (СП) (рег. № 05-2-602), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК ВИЧ-1 набором «РеалБест ДНК ВИЧ» (СП) определяется по стандартному образцу предприятия СОП ДНК ВИЧ (СП) (образец №1) (рег. № 05-2-602), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1): клинические испытания, проведенные на 240 положительных образцах цельной крови и сухих пятен крови от 120 ВИЧ-инфицированных пациентов, показали 100 % чувствительность (интервал 97,5 % - 100 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1): клинические испытания, проведенные на 188 отрицательных образцах цельной крови и сухих пятен крови от 94 условно здоровых доноров, показали 100 % специфичность (интервал 96,9 % - 100 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР/ОТ-ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма «Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма «Qiagen», Германия) или планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», АО «Ламинарные системы»);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма «Eppendorf», Германия);

– дозаторы механические одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (например, фирма FinnTip, Финляндия);

– одноразовые полипропиленовые пробирки на 2 мл (например, фирма «SSI», США);

– магнитный штатив для выделения нуклеиновых кислот (АО «Вектор-Бест»);

- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма «Хеликон», Россия);
- отсасыватель медицинский (например, В-40, «ВИСМА-ПЛАНАР», республика Беларусь);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный)

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка, хранение и транспортировка анализируемых образцов.

6.1.1. Приготовление сухих пятен крови

Процедуру приготовления сухих пятен крови проводить в соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO/CDS/CSR/EDC/2001.16 Guidelines for Using HIV Testing Technologies in Surveillance, 2009 update).

На каждого пациента должна приходиться одна карточка. Образец цельной крови тщательно перемешать. На каждый круг карточки дозатором с отдельным наконечником аккуратно нанести 50 мкл цельной крови. Во время нанесения крови на бумагу необходимо, чтобы капля заняла большую часть круга. Правильно заполненной считается карточка, у которой хотя бы три круга заполнены кровью правильно.

Внимание! Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной крови.

После нанесения крови на карточку, карту необходимо просушить при температуре (18-25) °С в течение 4-12 часов (беречь от прямых солнечных лучей).

6.1.2. Хранение и транспортировка образцов

Необходимое количество индивидуальных цефленовых пакетов с осушителем промаркировать и вскрыть со стороны замка. Упаковать каждую карточку с сухими пятнами крови в соответствующий пакет, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

Транспортировать и хранить образцы при температуре (18-25) °С до 2 недель; при температуре от (2-8) °С до 6 месяцев.

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку (кроме упаковки с ГРС!) и выдержать анализируемые образцы и компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 минут.

6.2.2. Во флакон с ПКО добавить 1 мл РВК, аккуратно перемешать, выдержать 15 минут при комнатной температуре, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 100 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

6.2.3. ОКО готов к применению.

После вскрытия флакона хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца.

6.2.4. Перед началом работы прогреть лизирующий раствор при (50-60) °С до растворения осадка, перемешать.

7. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОПРОБ

7.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объемом 2 мл (по количеству анализируемых образцов, включая контроли). Установить их в штатив.

7.2. Для отрицательного контроля в пробирку (маркированную «ОКО») внести 100 мкл ОКО.

7.3. Для положительного контроля в пробирку (маркированную «ПКО») внести 70 мкл ОКО и 30 мкл ПКО.

7.4. Для каждого образца вырезать в соответствующие пробирки круги с сухими пятнами крови.

Внимание: Для получения достаточного количества материала необходимо вырезать одно целое пятно крови максимально полно. Для достижения высокой эффективности выделения рекомендуется разделить полученный круг на фрагменты.

7.5. В каждую пробирку, не задевая стенок, внести по 600 мкл лизирующего раствора. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Выдержать в термошейкере в течение 20 минут при 65°С с частотой вращения 1300 об/мин.

7.6. Отобрать и подписать необходимое для работы количество новых пробирок объемом 2 мл (по количеству анализируемых образцов, кроме ПКО и ОКО). Установить их в штатив.

7.7. Пробирки из термостата перенести в микроцентрифугу. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 1 минуты при температуре (18-25) °С.

7.8. Перенести надосадочную жидкость из каждой пробирки с исследуемыми образцами в соответствующие новые пробирки (кроме ПКО и ОКО).

Внимание! Необходимо перенести максимальное количество жидкости. Для этого во время отбора жидкости наконечником максимально полно отжать бумагу, находящуюся в осадке. Допустимо попадание небольшого количества бумаги вместе с отобранной жидкостью в новые пробирки.

7.9. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом до состояния гомогенной суспензии. В каждую пробирку с образцами и контролями внести по 10 мкл сорбента.

7.10. В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести по 750 мкл осадителя НК.

7.11. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 секунд. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 5 минут при температуре (18-25) °С.

7.12. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки с помощью медицинского отсасывателя удалить надосадочную жидкость, используя отдельный наконечник и не прикасаясь к осадку магнитных частиц.

7.13. В каждую пробирку к осадку добавить 500 мкл раствора для отмывки № 1. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 с секунд. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 2 минут на микроцентрифуге.

7.14. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки с помощью медицинского отсасывателя удалить надосадочную жидкость, используя отдельный наконечник и не прикасаясь к осадку магнитных частиц.

7.15. В каждую пробирку к осадку добавить по 300 мкл раствора для отмывки № 2. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 секунд. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 2 минут на микроцентрифуге.

7.16. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки с помощью медицинского отсасывателя удалить надосадочную жидкость, используя отдельный наконечник и не прикасаясь к осадку магнитных частиц.

7.17. Высушить осадки в открытых пробирках в течение 2-3 минут при температуре (18-25) °С.

7.18. В каждую пробирку к осадку добавить 200 мкл элюирующего раствора. Тщательно перемешать на вортексе, ресуспендируя магнитный осадок. Инкубировать в термощейкере в течение 5 минут при 65 °С с частотой вращения 1300 об/мин. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин в течение 1 минуты. Пробы готовы к постановке ПЦР

Внимание! Выделенная ДНК хранится при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Пробирки с подготовленными пробами установить в магнитный штатив.

8.2. Вскрыть упаковку с ГРС и отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2-8)°С составляет 3 месяца.

8.3. Пробирки с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! При использовании амплификатора «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q» надписи следует располагать на крышке пробирок. При использовании

амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» надписи следует располагать на боковой части пробирок.

8.4. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК (из пробирок, установленных в магнитный штатив). Не захватывать осадок! Плотнo закрыть пробирки крышками.

8.5. Поместить пробирки в амплификатор.

8.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

– для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»:

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд);

– для приборов «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q»:

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 40 секунд);

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °C.

8.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК НМBS и ДНК ВИЧ-1:

«FAM» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Green» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК НМBS; «ROX» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Orange» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК ВИЧ-1.

8.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

8.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Условия анализа и учёта результатов.

9.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК гена НМBS в канале «FAM/Green» и определять значение порогового цикла Ct НМBS.

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВИЧ-1 в канале «ROX/Orange» и определять значение порогового цикла Ct ПКО;

9.1.2. В ОКО не должно фиксироваться нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX»/«Orange», а также нарастание сигнала амплификации ДНК гена НМBS человека по каналу «FAM»/«Green».

Если для ОКО значение C_t по каналу «FAM»/«Green» меньше или равно 25 или по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (п. 9.2.3.).

9.1.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК гена HMBS (канал «FAM/Green») и определять C_t HMBS.

9.2. Учёт результатов.

9.2.1. Анализируемый образец считается положительным, то есть содержащим ДНК ВИЧ-1, если для этого образца значение C_t в канале «ROX/Orange» меньше или равно 40.

9.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным, то есть не содержащим ДНК ВИЧ-1, если для этого образца значение C_t в канале «ROX/Orange» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t HMBS больше 30 или не определяется, то результат не подлежит учёту как отрицательный. Необходим повторный забор материала и повторный анализ данного образца.

9.2.3. В случае контаминации ДНК ВИЧ-1 ($C_{t_{\text{ROX}} \text{ ОКО}} \leq 40$) все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

В случае контаминации ДНК гена HMBS ($C_{t_{\text{FAM}} \text{ ОКО}} \leq 25$) все отрицательные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен отрицательный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал положительный результат, следует учитывать как положительные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК ВИЧ» (СП), следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
АО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Зам. директора по научной работе ГБУЗ МО
«Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского»
д.м.н., профессор



А.В. Молочков

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 10
листов. Директор по технологиям и
качеству АО "Вектор-Бест"

28 " 10 / 2017 г. Масяго А.В.



Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.
Руководитель лабораторного отдела ГБУЗ МО
МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

28 " 04 / 2017 г. Кудрявцева Е.Н.



Приказом Росздравнадзора
от 12.10.12 № 1897-17/12

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И. Покровский
«13» 09 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления провирусной ДНК вируса
иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® ДНК-ВИЧ-FL»

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 16 листов.
Директор по технологии и качеству
АО «Вектор-Бест»

А.В. Масяго
2012 г.



АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	9
ФОРМАТ FRT.....	10
СОСТАВ.....	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	14
А. Подготовка пробирок для амплификации.....	14
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».....	15
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	18
СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	18
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из цельной крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»	19
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК из сухих пятен крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»	21
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция ДНК из цельной крови при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В»	23
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Экстракция ДНК из цельной крови при использовании автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (BioMerieux, Франция)	25
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	29

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВИЧ-1	- вирус иммунодефицита человека типа 1
ВКО	- внутренний контрольный образец
К-	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- положительный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FL	- флуоресцентная детекция
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® ДНК-ВИЧ-FL» предназначен для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) путем амплификации специфического фрагмента провирусной ДНК методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из цельной крови человека, либо сухого пятна крови.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя два этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала и амплификацию участков провирусной ДНК и ДНК эндогенного внутреннего контроля (ВКО) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (формат FRT). По каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ДНК ВКО. По каналу, соответствующему флуорофору JOE, детектируется продукт амплификации провирусной ДНК ВИЧ-1.

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/EC.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 6 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «Гемолитик» (1 флакон), «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплект расходных материалов для сухих пятен крови, комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100, раствор для лизиса (2 флакона), раствор для преципитации (1 флакон), «Гемолитик» (1 флакон), «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 3 включает комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 100, «Гемолитик» (2 флакона), «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 4 включает комплект реагентов для автоматической станции выделения нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция), «Гемолитик» (3 флакона), «ПЦР-комплект» вариант FRT (3 шт).

Форма 5 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 6 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из клинического материала (**цельная кровь, сухие пятна крови**) методом преципитации и амплификацию провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и ДНК эндогенного внутреннего контроля с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 3 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из клинического материала (**цельная кровь**) методом сорбции на силикагеле и амплификацию провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и ДНК эндогенного внутреннего контроля с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 4 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего автоматическую экстракцию ДНК из клинического материала (**цельная кровь**) с использованием автоматической станции NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) и амплификацию провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и ДНК эндогенного внутреннего контроля с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 5 предназначена для проведения амплификации провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и ДНК эндогенного внутреннего контроля с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 6 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Формы 3 и 4 предназначены для проведения ПЦР-исследования при использовании в качестве клинического материала только образцов цельной крови.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 6 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Объем клинического материала, мкл	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ДНК ВИЧ-1 ²
Цельная кровь	«РИБО-преп», «ДНК-сорб-В»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	250	100
		«ПЦР-комплект» вариант FRT	100	250
Цельная кровь	NucliSENS easyMAG	«ПЦР-комплект» вариант FRT	100	1x10 ³
Сухая капля крови	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	(один круг, d=12 мм)	1x10 ³

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной ДНК/РНК следующих организмов и вирусов: вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита D, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса типы 1, 2, вирус ветряной оспы, вирус герпеса человека типы 6, 8, парвовирус В19, вирус клещевого энцефалита, вирус лихорадки западного Нила, аденовирус типы 2, 3, 7, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Homo sapiens*.

Перекрестные реакции для указанных организмов и вирусов зарегистрированы не были.

² Количество геномных эквивалентов (ГЭ) ДНК ВИЧ-1 в 1 мл образца клинического материала.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть односторонним. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании

работы.

- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 1. Экстракция ДНК из клинического материала

1. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008), «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009), комплект реагентов для автоматической станции выделения РНК/ДНК NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 5.
2. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» (до 16000 g).
4. Вортекс.
5. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
6. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
7. Автоматические дозаторы переменного объема.
8. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл в штативах.
9. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
10. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
12. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
13. Емкость для сброса наконечников.

При работе с сухими пятнами крови:

14. Компостеры с диаметром 6 мм (например, Qiagen, Германия).

При использовании автоматических станций для выделения нуклеиновых кислот:

15. Автоматическая станция для выделения РНК/ДНК (например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)).
16. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для

экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) (bioMérieux, Франция)).

17. Для автоматической станции, например NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) требуется дополнительный комплект реагентов «ЕМ-плюс» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

ЗОНА 2. Проведение ПЦР и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
2. Центрифуга/вортекс.
3. Автоматические дозаторы переменного объема.
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл в штативах.
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
6. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость для сброса наконечников.
9. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000, (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
10. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Ахуген, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Для проведения анализа используются:

1. Свежая цельная кровь, взятая утром натощак в пробирку с раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта. После взятия пробирка с кровью закрывается крышкой, перемешивается переворачиванием 3-4 раза и хранится при температуре от 2 до 8 °С не более 48 ч.
2. Сухие пятна крови, высушенные на бумажной карточке типа 903® (например, Whatman, Германия) или аналогичной. Процедуру приготовления сухих пятен крови проводить в соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO/CDS/CSR/EDC/2001.16 Guidelines for Using HIV Testing Technologies in Surveillance, 2009 update). Процедура нанесения крови на бумагу: на каждого пациента должна приходиться одна карточка. На каждый круг карточки наносится одна капля крови (около 50 мкл). Во время нанесения крови на бумагу необходимо чтобы капля заняла большую часть круга. Правильно заполненной карточка считается та, у которой хотя бы три круга заполнены кровью правильно. После нанесения крови на карточку, карту необходимо просушить при температуре от 18 до 25 °С в течение 4–12 ч (беречь от прямых солнечных лучей). Затем для транспортировки или хранения карточки упаковываются в пакеты типа Zip-Lock (пакеты, защищающие от повышенной влажности) вместе с осушителями (до 10 шт. на пакет). В каждый пакет рекомендуется вкладывать индикатор влажности (1 шт. на пакет). В один пакет может быть упаковано до 10 индивидуальных карточек. Высушенные и упакованные карточки при низких условиях влажности могут храниться при 2–8 °С в течение 6 мес. Карточки с сухими пятнами крови могут быть транспортированы в лабораторию в течение двух недель при комнатной температуре.

ФОРМАТ FRT
СОСТАВ

Комплект расходных материалов для сухих пятен крови – комплект для получения, транспортировки и хранения сухих пятен крови – включает:

Расходный материал	Кол-во
Карточка для забора крови Whatman 903	100 шт.
Пакет Zip-Lock	100 шт.
Осушитель	100 шт.

Комплект рассчитан на взятие, транспортировку и хранение проб крови от 100 пациентов. Входит в форму комплектации 2.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная голубая жидкость ³	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

Входит в состав формы комплектации 1, 2.

В составе формы 2 к комплекту реагентов «РИБО-преп» прилагаются:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная голубая жидкость ⁶	30	2 флакона
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон

Комплект реагентов в форме комплектации 1 рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли, в случае если в качестве клинического материала используется цельная кровь, и из 42 проб, включая контроли, в случае если в качестве клинического материала используются сухие пятна крови.

Комплект реагентов в форме комплектации 2 рассчитан на экстракцию РНК/ДНК

³ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

из 100 проб, включая контроли, в случае если в качестве клинического материала используется цельная кровь или сухие пятна крови.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 100 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,25	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

к комплекту реагентов «ДНК-сорб-В» прилагается:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	1 пробирка

Комплект реагентов для автоматической станции выделения нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Буфер для лизиса (NucliSens easyMAG Lysis Buffer)	Прозрачная бесцветная жидкость	1000	1 флакон
Буфер для экстракции 1 (NucliSens easyMAG Extraction Buffer 1)	Прозрачная бесцветная жидкость	1000	2 флакона
Буфер для экстракции 2 (NucliSens easyMAG Extraction Buffer 2)	Прозрачная бесцветная жидкость	1000	2 флакона
Буфер для экстракции 3 (NucliSens easyMAG Extraction Buffer 3)	Прозрачная бесцветная жидкость	1000	2 флакона
Магнитная силика (NucliSens easyMAG Magnetic Silica)	Суспензия черного цвета	0,6	24 пробирки

Комплект реагентов для автоматической станции выделения NucliSENS easyMAG рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 288 проб, включая контроли.

ФОРМАТ FRT

К комплекту реагентов прилагается комплект реагентов «ЕМ-плюс»:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
RT-G	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	3,0	1 пробирка

Комплект реагентов «ЕМ-плюс» рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 288 проб, включая контроли.

Гемолитик – реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Гемолитик	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон

Реагент рассчитан на предобработку 100 клинических образцов, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 2 (1 флакон), 3 (2 флакона), 4 (3 флакона).

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,24	8 пробирок
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	8 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	8 пробирок
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,07	8 пробирок

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT прилагается следующий реагент:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПКО ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на 120 реакций, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 3 и 5 (1 шт.), 4 (3 шт.).

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.

ФОРМАТ FRT

режиме «реального времени».

- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® ДНК-ВИЧ-FL».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Порядок работы с комплектами реагентов описан в Приложениях 1-4 к данной инструкции:

- при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» для экстракции ДНК из цельной крови порядок работы см. в **приложении 1** «Экстракция ДНК из цельной крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп».
- при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» для экстракции ДНК из сухих пятен крови порядок работы см. в **приложении 2** «Экстракция ДНК из сухих пятен крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп».
- при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» порядок работы см. в **приложении 3** «Экстракция ДНК из цельной крови при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В».
- при использовании автоматической станций для выделения нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (BioMerieux, Франция) из цельной крови порядок работы см. в **приложении 4** «Экстракция ДНК из цельной крови при использовании автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот».

Также см. методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® ДНК-ВИЧ-FL».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Общий объем реакционной смеси – 50 мкл, включая объем пробы ДНК – 25 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. Приготовить реакционную смесь на 15 реакций. Для этого в пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT ВИЧ добавить 160 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT и 16 мкл полимеразы (TaqF), тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки. Остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! В случае необходимости анализа образцов, количество которых, включая контроли, не кратно 16, рекомендуется приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке на 1,5 мл из расчета 15 мкл ПЦР-смеси-1-FRT ВИЧ, 10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT и 1 мкл полимеразы (TaqF) на одну пробу. Смесь необходимо приготовить с запасом на 1 образец. После приготовления реакционной смеси, тщательно перемешать ее на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

3. Внести в каждую пробирку по 25 мкл готовой реакционной смеси.
4. В пробирки с реакционной смесью, используя наконечники с фильтром, внести по 25 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Осторожно перемешать пипетированием.

ВНИМАНИЕ! При добавлении ДНК-проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» и NucliSENS easyMAG необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

5. Для каждой панели поставить 2 контрольных реакции:
 - а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 25 мкл ТЕ-буфера.
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 25 мкл ПКД ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека.

Пробирки с добавленными контрольными образцами необходимо

воздуха.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать прибор (амплификатор в системной детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс ДНК-ВИЧ» (см. табл. 1).

Таблица 1

Программа «АмплиСенс ДНК-ВИЧ»

Цикл	Приборы роторного типа ⁴			Приборы планшетного типа ⁵ (за исключение приборов фирмы «ДНК-Технология» ⁶)			Приборы фирмы «ДНК-Технология» ⁶		
	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	20 с	5	95	20 с	5	95	20 с	5
	52	30 с		52	30 с		52	30 с	
	72	30 с		72	30 с		72	30 с	
3	95	20 с	40	95	20 с	42	95	5 с	42
	55	30 с детекция флуоресц. сигнала		55	40 с детекция флуоресц. сигнала		60	30 с	
	72	30 с		72	30 с		55	40 с детекция флуоресц. сигнала	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM/Green и HEX/JOE/Yellow.

3. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
4. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
5. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

⁴ например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁵ например, iCycler iQ, iQ5, Mx3000P и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁶ например, «ДТ-96» и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВКО,
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации участка провирусной ДНК ВИЧ-1 (ПКО).

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- **ДНК ВИЧ-1 обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE (ДНК ВИЧ-1) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение, и в таблице результатов по каналу FAM (ВКО) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение.
- **ДНК ВИЧ-1 не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE (ДНК ВИЧ-1) значение порогового цикла *Ct* не определено (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или превышает указанное граничное значение, а в таблице результатов по каналу FAM (ВКО) определено значение порогового цикла *Ct* не превышающее, указанное граничное значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM (ВКО) значение порогового цикла *Ct* не определено (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или превышает указанное граничное значение.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 2).

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, <i>Ct</i>	
		по каналу для флуорофора JOE	по каналу для флуорофора FAM
ОК	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Значение отсутствует или определено значение больше граничного
ПК	Экстракции ДНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если в пробе с положительным контролем экстракции ДНК (ПК) отсутствует положительный сигнал по какому-либо из каналов детекции. Возможная причина: ошибки при экстракции ДНК. Необходимо провести экстракцию еще раз.
2. Если в пробе с положительным контролем ПЦР (К+) отсутствует положительный сигнал по какому-либо из каналов детекции. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ПЦР. Необходимо провести ПЦР еще раз для всех образцов.
3. Если для данного образца, не определено значение порогового цикла *Ct* по каналу FAM (ВКО) или получено значение *Ct*, превышающее указанное значение. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа для данного образца, начиная с этапа экстракции.
4. Если в отрицательном контроле экстракции или ПЦР (ОК, К–) определено *Ct* меньше граничного, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

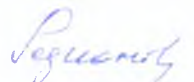
Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект расходных материалов для сухих пятен крови хранить при температуре от 15 до 25 °С. Комплект реагентов для автоматической станции выделения нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) хранить в соответствии с инструкцией производителя. Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» хранить при температуре от 2 до 25 °С, кроме ОКО. Комплекты реагентов «ЕМ-плюс», «РИБО-преп» и ОКО из комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре не выше минус 16 °С. Не допускается замораживание/оттаивание ПКО ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека более двух раз, после размораживания ПКО ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 мес. ПЦР-смесь-1-FRT ВИЧ, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT и полимеразу (TaqF) после размораживания не хранить. ПЦР-смесь-1-FRT ВИЧ хранить в защищенном от света месте.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® ДНК-ВИЧ-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)⁷.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора


Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»
Управления делами Президента
Российской Федерации


Е.Л. Никонов

⁷ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкет потребителя на сайте: www.amplisens.ru

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из цельной крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»

Объем клинического материала для экстракции ДНК – 0,1 мл или 0,25 мл.

Примечание – Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

Подготовка клинического материала при экстракции ДНК из крови

1. Взять пробирки на 1,5 мл с завинчивающейся крышкой для обработки необходимого количества проб и контролей, промаркировать. В пробирки, предназначенные для клинических проб, внести отдельными наконечниками по 1,0 мл гемолитика и по 0,25 мл исследуемой цельной крови соответственно маркировке. Если исследуется кровь новорожденных детей, к 1,0 мл гемолитика добавить 0,1 мл крови. Закрыть пробирки и аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе.
2. Оставить пробирки при комнатной температуре на 5 мин, затем еще раз аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 мин.
3. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка.

Полученный осадок лейкоцитов может быть немедленно лизирован или заморожен при температуре не выше минус 16 °С на две недели, а при температуре не выше минус 68 °С на длительное время.

Лизис клинического материала

1. Промаркировать одну дополнительную пробирку положительного контроля (ПК) и внести в нее 5 мкл ПКО ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека.
2. Промаркировать одну дополнительную пробирку отрицательного контроля (ОК) и внести в нее 5 мкл РНК-буфера.
3. Добавить в пробирки с лейкоцитами и в пробирки с контрольными образцами по 300 мкл раствора для лизиса.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при 65 °С в термостате.
5. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, перемешать на вортексе.
6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 13 тыс об/мин.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
9. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
12. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
16. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8 °С и в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК из сухих пятен крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»

Объем клинического материала для экстракции ДНК – 1 сухое пятно крови.

Примечание – Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

1. Взять пробирки на 1,5 мл для обработки необходимого количества проб и контролей, промаркировать.
2. Взять необходимое количество заранее простерилизованных компостеров (с диаметром 6 мм).
3. Используя для каждого образца отдельный компостер выбить в соответствующие пробирки круги с сухими пятнами крови. Для получения достаточного количества материала компостером необходимо вырезать одно целое пятно крови, последовательно совершая 4-5 вырезаний.
4. Промаркировать одну дополнительную пробирку положительного контроля (ПК) и внести в нее **5 мкл ПКО ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека**.
5. Промаркировать одну дополнительную пробирку отрицательного контроля (ОК) и внести в нее **5 мкл РНК-буфера**.
6. В пробирки, содержащие бумагу с сухими пятнами крови, и с контрольными образцами добавить по **700 мкл раствора для лизиса**. Закрыть пробирки и аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе.
7. Переставить пробирки в термостат и прогреть при **65 °С в течение 30 мин**. Во время инкубации пробирки необходимо встряхивать на вортексе каждые 8-10 мин.
8. Во время инкубации необходимо приготовить и промаркировать необходимое количество свежих пробирок на 1,5 мл для клинических образцов.
9. Вынуть из термостата пробирки и процентрифугировать их на микроцентрифуге в течение **1 мин** при **10 тыс об/мин**.
10. Для клинических образцов перенести надосадочную жидкость в соответствующие промаркированные свежие пробирки.

ВНИМАНИЕ! Необходимо перенести максимальное количество жидкости. Для этого во время отбора жидкости наконечником необходимо отжимать бумагу, находящуюся в осадке. Допустимо попадание небольшого количества бумаги вместе с отобранной жидкостью в свежие пробирки.

11. Добавить в пробирки по **600 мкл раствора для преципитации**, перемешать на

вортексе.

- 12.Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 13 тыс об/мин.
 - 13.Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
 - 14.Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
 - 15.Процентрифугировать при 13 тыс об/мин в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.
 - 16.Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
 - 17.Добавить в пробирки по 200 мкл раствора для отмывки 4, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
 - 18.Процентрифугировать при 13 тыс об/мин в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.
 - 19.Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
 - 20.Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
 - 21.Добавить в пробирки по 50 мкл РНК-буфера. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
 - 22.Процентрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.
- Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8 °С и в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция ДНК из цельной крови при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В»

Объем клинического материала для экстракции ДНК – 0,1 мл или 0,25 мл.

Примечание – Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

Подготовка клинического материала при экстракции ДНК из крови

1. Взять пробирки на 1,5 мл с завинчивающейся крышкой для обработки необходимого количества проб и контролей, промаркировать. В пробирки, предназначенные для клинических проб, внести отдельными наконечниками по 1,0 мл гемолитика и по 0,25 мл исследуемой цельной крови соответственно маркировке. Закрыть пробирки и аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе. Если исследуется кровь новорожденных детей, к 1,0 мл гемолитика добавить 0,1 мл крови.
2. Оставить пробирки при комнатной температуре на 3 мин, затем еще раз аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 3 мин.
3. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка.
4. К осадку добавить 0,5 мл гемолитика, перемешать на вортексе и оставить на 3 мин.
5. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка.
6. Повторить отмывку лейкоцитов гемолитиком. После последней отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов).

Полученный осадок лейкоцитов может быть немедленно лизирован или заморожен при температуре не выше минус 16 °С на две недели, а при температуре не выше минус 68 °С на длительное время.

Лизис клинического материала

1. В каждую пробирку к осадку лейкоцитов добавить по 300 мкл лизирующего раствора, перемешать на вортексе до полного суспендирования клеток.
2. Приготовление положительного контроля (ПК). В отдельную пробирку,

предназначенную для положительного контроля, добавить 300 мкл лизирующего раствора, 95 мкл ОКО и 5 мкл ПК О ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека.

3. Приготовление отрицательного контроля (ОК). В отдельную пробирку, предназначенную для отрицательного контроля, добавить 300 мкл лизирующего раствора и 5 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК.
4. Тщательно ресуспендировать сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 10 мин, перемешивая осадок каждые две минуты.
5. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
6. Добавить в пробы по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
7. Добавить в пробы по 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Повторить пункт 7.
9. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °C на 10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
10. В пробирки добавить по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат 65 °C на 5 мин.
11. Процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8 °C и в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °C.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Экстракция ДНК из цельной крови при использовании автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (BioMérieux, Франция)

Объем клинического материала для экстракции ДНК – 100 мкл.

Порядок работы

Подготовка клинического материала при экстракции ДНК из крови

1. Взять пробирки на 1,5 мл с завинчивающейся крышкой для обработки необходимого количества проб и контролей, промаркировать. В пробирки, предназначенные для клинических проб, внести отдельными наконечниками по 1,0 мл гемолитика и по 100 мкл исследуемой цельной крови, соответственно маркировке. Закрыть пробирки и аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе.
2. Оставить пробирки при комнатной температуре на 10 мин, перемешивания их на вортексе каждые 2-3 мин.
3. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка.

Полученный осадок лейкоцитов может быть немедленно лизирован или заморожен при температуре не выше минус 16 °C на две недели, а при температуре не выше минус 68 °C на длительное время.

А. Экстракция ДНК с лизисом образца вне прибора

1. Добавить 30 мл (все содержимое флакона) компонента RT-G из комплекта «ЕМ-плюс» во флакон с буфером для лизиса NucliSens, закрыть крышку флакона и аккуратно перемешать переворачиванием 7-10 раз (данная процедура выполняется 1 раз для каждого комплекта реагентов).
2. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции ДНК, следуя инструкции к прибору.
 - а) В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для экстракции – *Other*, объем образца (*volume*) – 100 mkl, объем элюции (*Eluate*) – 50 mkl, тип образца (*Type*) – *Lysed*, очередность экстракции ДНК в образцах (*priority*) – *normal*.
 - б) Создать новый протокол экстракции ДНК и сохранить его. При введении параметров конфигурации установить режимы: *Off-board Lysis Incubation*,

Формат FRT Форма 1: REF TR-V0-G-P1(RG.iQ.Mx.Dt); Форма 2: REF TR-V0-G-P2(RG.iQ.Mx.Dt); Форма 3: REF TR-V0-G-S(RG.iQ.Mx.Dt) / VER 29.05.12 / стр. 25 из 28

Off-board Silica Incubation, Sample Addition Guidance, Reagent Tracking должны быть неактивны (выключены). При заполнении таблицы исследуемых образцов в поле **Request** выбрать протокол **Generic 2.0.1**.

- в) Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
- В пробирки с осадком лейкоцитов внести по **450 мкл** смеси **буфера для лизиса NucliSens** и компонента **RT-G**. Закрыть пробирки, тщательно перемешать на вортексе и кратким центрифугированием осадить капли с крышек пробирок.
 - Из пробирок в соответствующие ячейки картриджа EasyMag перенести **весь объем исследуемых проб** отдельным наконечником с аэрозольным барьером.
 - Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль (ПК)**. Для этого в приготовленную ячейку добавить **5 мкл** ПКО ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека, затем **450 мкл** смеси **буфера для лизиса NucliSens** и компонента **RT-G** и тщательно перемешать пипетированием.
 - Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в ячейку добавить **5 мкл** ТЕ-буфера, затем **450 мкл** смеси **буфера для лизиса NucliSens** и компонента **RT-G** и тщательно перемешать пипетированием.
 - Оставить картридж на 10 мин при комнатной температуре для прохождения лизиса.
 - В отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл смешать магнитную силику NucliSens и компонент А (из комплекта «ЕМ-плюс») одноразовыми наконечниками с фильтрами.

Таблица 3

Количество образцов для экстракции ДНК	Количество магнитной силики NucliSens, (мкл)	Количество компонента А «ЕМ-плюс», (мкл)
1	50	10
8	450	90
16	850	170
24	1250	250
(полная загрузка прибора)	(с запасом на 25 проб)	

- Добавить в каждую ячейку картриджа отдельным наконечником по **60 мкл** подготовленной смеси магнитной силики NucliSens и компонента А. Жидкость в каждой ячейке тщательно перемешать пипетированием с помощью дозатора с отдельными наконечниками с фильтром на 1000 мкл.
- Оставить картридж на 10 мин при комнатной температуре для прохождения сорбции.

- Загрузить картридж с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции ДНК с лизисом образцов вне прибора (**off board**).
- После окончания экстракции ДНК извлечь картридж с образцами из прибора и не позднее 30 мин после окончания процедуры экстракции ДНК провести ПЦР.

Для длительного хранения препарата ДНК необходимо перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С или в течение года при температуре не выше минус 16 °С.

Б. Экстракция ДНК с автоматическим лизисом образца в приборе

- Добавить 30 мл (все содержимое флакона) компонента **RT-G** из комплекта «ЕМ-плюс» во флакон с буфером для лизиса NucliSens, закрыть крышку флакона и аккуратно перемешать переворачиванием 7-10 раз (данная процедура выполняется 1 раз для каждого комплекта реагентов). Поставить флакон в прибор.
- В пробирки с осадками лейкоцитов раскатать по **450 мкл** смеси **буфера для лизиса NucliSens** и компонента **RT-G**. Закрыть пробирки, тщательно перемешать на вортексе и кратким центрифугированием осадить капли с крышек пробирок.
- Из пробирок в соответствующие ячейки картриджа EasyMag перенести **весь объем исследуемых проб** отдельным наконечником с аэрозольным барьером.
- Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль (ПК)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ПК, добавить **5 мкл** ПКО ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека.
- Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ОК, добавить **5 мкл** ТЕ-буфера.
- Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции ДНК, следуя инструкции к прибору.
 - В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для экстракции ДНК – **Other**, объем образца (**volume**) – **100 mkl**, объем элюции (**Eluate**) – **50 mkl**, тип образца (**Type**) – **primary**, очередность экстракции ДНК в образцах (**priority**) – **normal**.
 - Создать новый протокол экстракции ДНК и сохранить его. При введении параметров конфигурации установить режимы: **On-board Lysis Incubation**, **On-board Silica Incubation, Sample Addition Guidance, Reagent Tracking**

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

должны быть активны (включены). При заполнении таблицы исследуемых образцов в поле **Request** выбрать протокол **Generic 2.0.1**.

- в) Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
 7. Загрузить картридж с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции ДНК с лизисом образцов в приборе (*on board*).
 8. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении **Instrument State – Idle** (приблизительно 15 мин).
 9. В отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл смешать магнитную силику NucliSens и компонент А (из комплекта «ЕМ-плюс»), см. табл. 3.
 10. Открыть крышку прибора и добавить в каждую ячейку отдельным наконечником по 60 мкл подготовленной смеси магнитной силики NucliSens и компонента А. Тщательно перемешать пипетированием с помощью дозатора с одноразовыми наконечниками с фильтром на 1000 мкл.
 11. Запустить на приборе программу продолжения экстракции ДНК.
 12. После окончания экстракции ДНК, извлечь картридж с образцами из прибора и не позднее 30 мин после окончания процедуры экстракции ДНК провести ПЦР.
- Для длительного хранения препарата ДНК необходимо перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить в течение 1 недели при температуре от 2 до 8 °C или в течение года при температуре не выше минус 16 °C.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации



Код партии



Максимальное
число тестов



Изделие для in vitro
диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Ограничение
температуры



Не допускать
попадания
солнечного света



Верхнее ограничение
температуры



Дата
изготовления



Производитель

ПАСПОРТ № 228-16

РеалБест ДНК ВИЧ (СП)

Набор реагентов для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1)
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

ТУ 9398-535-23548172-2016

Номер серии 1

Дата изготовления 03.02.2016
Дата выдачи паспорта 03.02.2016

Хранить при температуре 2-8°С. Транспортировать при температуре 2-8°С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток.

Срок годности наборов до 03.02.2017



Состав набора	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Лизирующий раствор, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость. Допускается наличие осадка, исчезающего при нагревании, 8 флаконов по 7 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 8 флаконов по 7 мл, (соответствует)
Осадитель НК, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 12 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 12 мл, (соответствует)
Раствор для отмывки № 1, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 8 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 8 мл, (соответствует)
Раствор для отмывки № 2, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 5 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 5 мл, (соответствует)
Элюирующий раствор, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 3 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 3 мл, (соответствует)
Сорбент (суспензия магнитных частиц), серия 1	Суспензия черно-бурых частиц, 1 флакон, 1 мл	Суспензия черно-бурых частиц, 1 флакон, 1 мл, (соответствует)
Раствор для восстановления контрольных образцов, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 флакон, 4 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 флакон, 4 мл, (соответствует)
Положительный контрольный образец, серия 1	Аморфная масса белого цвета, 1 флакон	Аморфная масса белого цвета, 1 флакон, (соответствует)
Отрицательный контрольный образец, серия 1	Прозрачная жидкость желтого цвета, допускается наличие опалесценции, 2 флакона по 2 мл	Прозрачная жидкость желтого цвета, 2 флакона по 2 мл, (соответствует)
Готовая реакционная смесь для ПЦР, серия 1	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок, (соответствует)
Принадлежности:		
Завинчивающаяся пластиковая крышка для флакона с ПКО	1 штука	1 штука (соответствует)
Бумажные карточки для сухих пятен крови	48 штук	48 штук (соответствует)
Пакеты для хранения и транспортировки образцов	48 штук	48 штук (соответствует)
Технические характеристики		
Чувствительность (выявление 50 копий ДНК ВИЧ-1 в сухом пятне крови), %	100	100 (соответствует)
Специфичность выявления ДНК ВИЧ-1 (по стандартному образцу предприятия), %	100	100 (соответствует)

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям
ТУ 9398-535-23548172-2016

Начальник ОБТК

[Handwritten signature]

В.В. ШАПРОВ



ПАСПОРТ № 290-16
РеалБест ДНК ВИЧ (СП)

Набор реагентов для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1)
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

ТУ 9398-535-23548172-2016

Номер серии 2

Дата изготовления 10.02.2016
Дата выдачи паспорта 10.02.2016

Хранить при температуре 2-8°С. Транспортировать при температуре 2-8°С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток.

Срок годности наборов до 10.02.2017



Состав набора	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Лизирующий раствор, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость. Допускается наличие осадка, исчезающего при нагревании, 8 флаконов по 7 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 8 флаконов по 7 мл, (соответствует)
Осадитель НК, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 12 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 12 мл, (соответствует)
Раствор для отмывки № 1, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 8 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 8 мл, (соответствует)
Раствор для отмывки № 2, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 5 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 5 мл, (соответствует)
Элюирующий раствор, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 3 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 3 мл, (соответствует)
Сорбент (суспензия магнитных частиц), серия 2	Суспензия черно-бурых частиц, 1 флакон, 1 мл	Суспензия черно-бурых частиц, 1 флакон, 1 мл, (соответствует)
Раствор для восстановления контрольных образцов, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 флакон, 4 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 флакон, 4 мл, (соответствует)
Положительный контрольный образец, серия 2	Аморфная масса белого цвета, 1 флакон	Аморфная масса белого цвета, 1 флакон, (соответствует)
Отрицательный контрольный образец, серия 2	Прозрачная жидкость желтого цвета, допускается наличие опалесценции, 2 флакона по 2 мл	Прозрачная жидкость желтого цвета, 2 флакона по 2 мл, (соответствует)
Готовая реакционная смесь для ПЦР, серия 2	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок, (соответствует)
Принадлежности:		
Завинчивающаяся пластиковая крышка для флакона с ПКО	1 штука	1 штука (соответствует)
Бумажные карточки для сухих пятен крови	48 штук	48 штук (соответствует)
Пакеты для хранения и транспортировки образцов	48 штук	48 штук (соответствует)
Технические характеристики		
Чувствительность (выявление 50 копий ДНК ВИЧ-1 в сухом пятне крови), %	100	100 (соответствует)
Специфичность выявления ДНК ВИЧ-1 (по стандартному образцу предприятия), %	100	100 (соответствует)

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям
ТУ 9398-535-23548172-2016

Начальник ОБТК

Handwritten signature

В.В. ШАПРОВ



ПАСПОРТ № 227-16
РеалБест ДНК ВИЧ (ЦК)

Набор реагентов для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1)
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

ТУ 9398-535-23548172-2016

Номер серии 1

Дата изготовления 03.02.2016
Дата выдачи паспорта 03.02.2016

Срок годности наборов до 03.02.2017



Хранить при температуре 2-8°С. Транспортировать при температуре 2-8°С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток.

Состав набора	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Раствор для гемолиза, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 14 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 14 мл, (соответствует)
Лизирующий раствор, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость. Допускается наличие осадка, исчезающего при нагревании, 8 флаконов по 4 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 8 флаконов по 4 мл, (соответствует)
Осадитель НК, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 12 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 12 мл, (соответствует)
Раствор для отмывки № 1, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 8 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 8 мл, (соответствует)
Раствор для отмывки № 2, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 5 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 5 мл, (соответствует)
Элюирующий раствор, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 3 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 3 мл, (соответствует)
Сорбент (суспензия магнитных частиц), серия 1	Суспензия черно-бурых частиц, 1 флакон, 1 мл	Суспензия черно-бурых частиц, 1 флакон, 1 мл, (соответствует)
Раствор для восстановления контрольных образцов, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 флакон, 4 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 флакон, 4 мл, (соответствует)
Положительный контрольный образец, серия 1	Аморфная масса белого цвета, 1 флакон	Аморфная масса белого цвета, 1 флакон, (соответствует)
Отрицательный контрольный образец, серия 1	Прозрачная жидкость желтого цвета, допускается наличие опалесценции, 2 флакона по 2 мл	Прозрачная жидкость желтого цвета, 2 флакона по 2 мл, (соответствует)
Готовая реакционная смесь для ПЦР, серия 1	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок, (соответствует)
Принадлежности:		
Завинчивающаяся пластиковая крышка для флакона с ПКО	1 штука	1 штука (соответствует)
Технические характеристики		
Чувствительность (выявление 25 копий ДНК ВИЧ-1 в объеме выделяемой пробы), %	100	100 (соответствует)
Специфичность выявления ДНК ВИЧ-1 (по стандартному образцу предприятия), %	100	100 (соответствует)

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям
ТУ 9398-535-23548172-2016

Начальник ОБТК

Handwritten signature

В.В. ШАПРОВ



ПАСПОРТ № 291-16

РеалБест ДНК ВИЧ (ЦК)

Набор реагентов для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

ТУ 9398-535-23548172-2016

Номер серии 2

Дата изготовления 10.02.2016
Дата выдачи паспорта 10.02.2016

Хранить при температуре 2-8°С. Транспортировать при температуре 2-8°С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток.

Срок годности наборов до 10.02.2017



Состав набора	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Раствор для гемолиза, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 14 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 14 мл, (соответствует)
Лизирующий раствор, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость. Допускается наличие осадка, исчезающего при нагревании, 8 флаконов по 4 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 8 флаконов по 4 мл, (соответствует)
Осадитель НК, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 12 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 12 мл, (соответствует)
Раствор для отмывки № 1, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 8 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 8 мл, (соответствует)
Раствор для отмывки № 2, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 5 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 5 мл, (соответствует)
Элюирующий раствор, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 3 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 3 мл, (соответствует)
Сорбент (суспензия магнитных частиц), серия 2	Суспензия черно-бурых частиц, 1 флакон, 1 мл	Суспензия черно-бурых частиц, 1 флакон, 1 мл, (соответствует)
Раствор для восстановления контрольных образцов, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 флакон, 4 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 флакон, 4 мл, (соответствует)
Положительный контрольный образец, серия 2	Аморфная масса белого цвета, 1 флакон	Аморфная масса белого цвета, 1 флакон, (соответствует)
Отрицательный контрольный образец, серия 2	Прозрачная жидкость желтого цвета, допускается наличие опалесценции, 2 флакона по 2 мл	Прозрачная жидкость желтого цвета, 2 флакона по 2 мл, (соответствует)
Готовая реакционная смесь для ПЦР, серия 2	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок, (соответствует)
Принадлежности:		
Завинчивающаяся пластиковая крышка для флакона с ПКО	1 штука	1 штука (соответствует)
Технические характеристики		
Чувствительность (выявление 25 копий ДНК ВИЧ-1 в объеме выделяемой пробы), %	100	100 (соответствует)
Специфичность выявления ДНК ВИЧ-1 (по стандартному образцу предприятия), %	100	100 (соответствует)

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям
ТУ 9398-535-23548172-2016

Начальник ОБТК

[Handwritten signature]

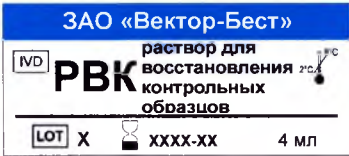
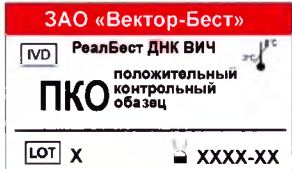
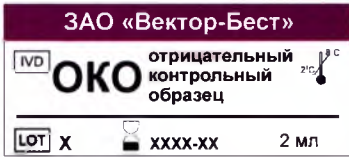
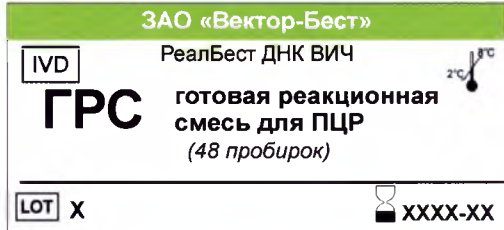
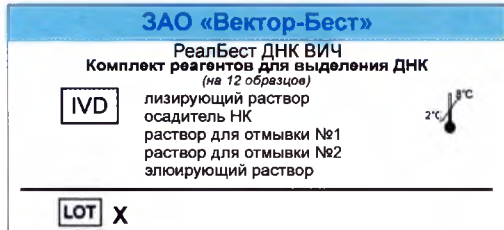
В.В. ШАПРОВ



Образцы маркировки на Набор реагентов для выявления вирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК ВИЧ)

1. Образцы этикеток на компоненты набора “РеалБест ДНК ВИЧ”(СП)

Наименование компонента	Этикетка
Лизирующий раствор	ЗАО «Вектор-Бест» IVD ЛР лизирующий раствор LOT x XXXX-XX 7 мл
Осадитель НК	ЗАО «Вектор-Бест» IVD Осадитель НК LOT x XXXX-XX 12 мл
Раствор для отмывки №1	ЗАО «Вектор-Бест» IVD раствор для отмывки №1 LOT x XXXX-XX 8 мл
Раствор для отмывки №2	ЗАО «Вектор-Бест» IVD раствор для отмывки №2 LOT x XXXX-XX 5 мл
Элюирующий раствор	ЗАО «Вектор-Бест» IVD Элюирующий раствор LOT x XXXX-XX 3 мл
Сорбент (суспензия магнитных частиц)	ЗАО «Вектор-Бест» IVD СОРБЕНТ (суспензия магнитных частиц) LOT x XXXX-XX 1 мл

Наименование компонента	Этикетка
Раствор для восстановления контрольных образцов	
Положительный контрольный образец	
Отрицательный контрольный образец	
Готовая реакционная смесь для ПЦР	
	

2. Образцы этикеток на коробку набора “РеалБест ДНК ВИЧ”(СП)

2.1. Верхняя этикетка.

набор реагентов для выявления
провирусной ДНК вируса иммунодефицита
человека (ВИЧ-1) методом полимеразной
цепной реакции в режиме реального времени

РеалБест ДНК ВИЧ (СП)

СОСТАВ:
Комплект реагентов для обработки клинических проб
и выделения ДНК
1. Лизирующий раствор
2. Осадитель НК;
3. Раствор для отмывки №1
4. Раствор для отмывки №2
5. Элюирующий раствор;
6. Сорбент (суспензия магнитных частиц)
Комплект контрольных образцов
1. Раствор для восстановления контрольных образцов
2. Положительный контрольный образец
3. Отрицательный контрольный образец
Комплект реагентов для проведения ПЦР
1. Готовая реакционная смесь для ПЦР

Принадлежности:
1. Завинчивающаяся пластиковая крышка для флакона с ПКО
2. Бумажные карточки для сухих пятен крови
3. Пакеты для хранения и транспортировки образцов

2.2. Боковая этикетка.

 48  X

ТУ 9398-535-23548172-2016
РУ  XXXX-XX-XX

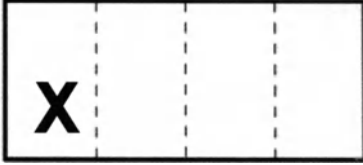
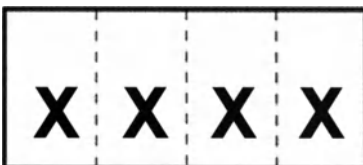
РеалБест ДНК ВИЧ (СП)

  2°C / 8°C

Примечание. Непосредственно на коробку типографским способом наносятся следующие надписи:

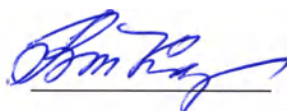
1. ЗАО “Вектор-Бест”
2. Россия, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово, тел/факс: (383) 332-67-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru

3. Образцы этикеток на ящик для наборов "РеалБест ДНК ВИЧ"(СП)

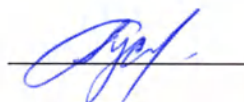
	REF D-XXXX	Набор реагентов для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени "РеалБест ДНК ВИЧ" (СП)	
	 XXXX-XX-XX		
	 YYYYY-YY-YY	LOT X	
	Масса нетто набора XX кг Масса нетто XX кг Масса брутто XX кг	Кол-во наборов	
 2°C 8°C		 ЗАО «Вектор-Бест» 630559 Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, АБК	

«СОГЛАСОВАНО»
 Директор по производству
 ЗАО «Вектор-Бест»

Коммерческий директор
 ЗАО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев
 «22» февраля 2016 г.



Ю.М. Гусев
 «22» февраля 2016 г.

Протипувано, протипувано
и скреплено і чату
Лист



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

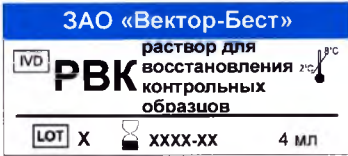
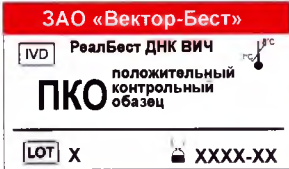
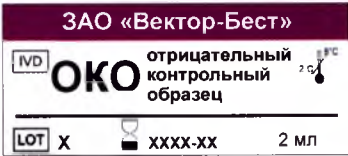
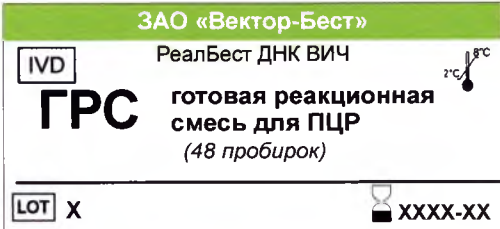
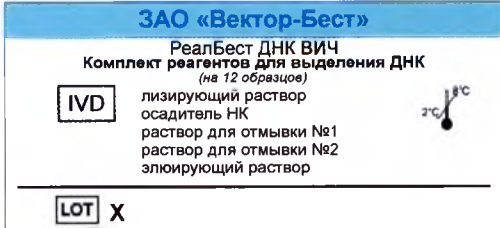
М.Д. Хусаинов

2016 г.

Образцы маркировки на Набор реагентов для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК ВИЧ)

1. Образцы этикеток на компоненты набора “РеалБест ДНК ВИЧ” (ЦК)

Наименование компонента	Этикетка
Раствор для гемолиза	
Лизирующий раствор	
Осадитель НК	
Раствор для отмывки №1	
Раствор для отмывки №2	
Элюирующий раствор	
Сорбент	

Наименование компонента	Этикетка
Раствор для восстановления контрольных образцов	
Положительный контрольный образец	
Отрицательный контрольный образец	
Готовая реакционная смесь для ПЦР	
	

2. Образцы этикеток на коробку набора “РеалБест ДНК ВИЧ”(ЦК)

2.1. Верхняя этикетка.

набор реагентов для выявления
провирсной ДНК вируса иммунодефицита
человека (ВИЧ-1) методом полимеразной
цепной реакции в режиме реального времени

РеалБест ДНК ВИЧ (ЦК)

СОСТАВ:

Комплект реагентов для обработки клинических проб
и выделения ДНК

1. Раствор для гемолиза
2. Лизирующий раствор
3. Осадитель НК;
4. Раствор для отмывки №1
5. Раствор для отмывки №2
6. Элюирующий раствор;
7. Сорбент (суспензия магнитных частиц)

Комплект контрольных образцов

1. Раствор для восстановления контрольных образцов
2. Положительный контрольный образец
3. Отрицательный контрольный образец

Комплект реагентов для проведения ПЦР

1. Готовая реакционная смесь для ПЦР

Принадлежности:

1. Завинчивающаяся пластиковая крышка для флакона с ПКО

2.2. Боковая этикетка.



LOT X

TU 9398-535-23548172-2016
РУ

XXXX-XX-XX

РеалБест ДНК ВИЧ (ЦК)

IVD



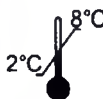
Примечание. Непосредственно на коробку типографским способом наносятся следующие надписи:

1. ЗАО “Вектор-Бест”

2. Россия, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово, тел/факс: (383) 332-67-67-49, 332-67-52

E-mail: vbmarket@vector-best.ru

3. Образцы этикеток на ящик для наборов "РеалБест ДНК ВИЧ"(ЦК)

	REF	D-XXXX	Набор реагентов для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени "РеалБест ДНК ВИЧ" (ЦК)	
		XXXX-XX-XX	LOT	X
		YYYY-YY-YY		
	Масса нетто набора	XX кг	Кол-во наборов	X X X X
Масса нетто	XX кг			
Масса брутто	XX кг			
		ЗАО «Вектор-Бест» 630559 Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, АБК		

«СОГЛАСОВАНО»

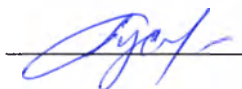
Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

Коммерческий директор
ЗАО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

«02» февраля 2016 г.



Ю.М. Гусев

«02» февраля 2016 г.



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
4 лист