

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора Федерального бюджетного
учреждения науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной службы по
надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека
(ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора)



А.В. Горелов
2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для диагностики in vitro

АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	14
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	17
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	18
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	18
СОСТАВ	21
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	24
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	24
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	25
Подготовка пробирок для обратной транскрипции и амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-LA (формы 1 и 3)	25
Подготовка пробирок для обратной транскрипции и амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L (формы 2 и 4)	27
Проведение обратной транскрипции и амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	28
Анализ и интерпретация результатов	30
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	39
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	41
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	42
ПРИЛОЖЕНИЕ А	43
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	46
ПРИЛОЖЕНИЕ В	49

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВИЧ-1	– вирус иммунодефицита человека типа 1
ВКО	– внутренний контрольный образец
K1, K2	– калибраторы
НК	– нуклеиновые кислоты
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОТ	– обратная транскрипция
ОТ-ПЦР	– полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПК1, ПК2	– положительные контроли экстракции
ПКО1, ПКО2	– положительные контрольные образцы
ПО	– программное обеспечение
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	– рибонуклеиновая кислота
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
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, далее – набор реагентов, предназначен для количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) в биологическом материале (плазма крови, собранной в пробирки с K₂ЭДТА или K₃ЭДТА) методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор выявляет ВИЧ-1 генетических групп M, N и O. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого материала.

В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которого лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется для исследования биологического материала, полученного от лиц инфицированных ВИЧ-1 вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

Набор реагентов не предназначен для использования в качестве скрининг-теста доноров крови на ВИЧ-1 и в качестве диагностического теста для подтверждения наличия ВИЧ-1 инфекции.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускается только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО) и одновременном проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемого вируса и кДНК ВКО с гибридационно-флуоресцентной детекцией. ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК проводится реакция обратной транскрипции с помощью фермента ТМ-ревертазы и амплификации участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Количественное определение кДНК ВИЧ-1 возможно при проведении ПЦР в режиме «реального времени» и основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией кДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). Для проведения количественного теста

экстракцию, обратную транскрипцию и амплификацию кДНК исследуемых образцов проводят одновременно с калибраторами K1, K2 и положительными контрольными образцами ПК1, ПК2, содержащими известную концентрацию РНК-мишени. Аттестация калибраторов K1, K2 и положительных контрольных образцов ПК1, ПК2 осуществляется относительно стандарта NIBSC HIV-1 RNA (3rd International standard) согласно пункту 5.5. ГОСТ ISO17511.

На этапе ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке проводятся 3 реакции – амплификация двух различных участков генома кДНК ВИЧ-1, а также амплификация последовательности кДНК ВКО. Результаты амплификации кДНК ВИЧ-1, а также кДНК ВКО регистрируются по трём различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
кДНК-мишень	кДНК ВКО	кДНК ВИЧ-1	кДНК ВИЧ-1
Область амплификации	Генно-инженерный конструкт	Область гена <i>pol</i>	5'UTR

Анализ концентрации по двум независимым областям амплификации генома ВИЧ-1 позволяет значительно снизить риск получения ложноотрицательных результатов и заниженных показателей вирусной нагрузки вследствие мутаций вируса.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «РИБО-преп» вариант 100; «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA; программное обеспечение АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo версия 1.0

Форма 2: «РИБО-преп» вариант 100; «ПЦР-комплект» вариант FRT-L; программное обеспечение АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo версия 1.0

Форма 3: «МАГНО-сорб» вариант 100-1000; «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA; программное обеспечение АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo версия 1.0

Форма 4: «МАГНО-сорб» вариант 100-1000; «ПЦР-комплект» вариант FRT-L; программное обеспечение АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo версия 1.0

Формы 1, 2, 3 и 4 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из биологического материала, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», позволяют провести калибровку набора реагентов и выявлять РНК в количественном формате.

Формы 1 и 3 рассчитаны на экстракцию и проведение 100 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Формы 2 и 4 рассчитаны на экстракцию и проведение 96 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Предел обнаружения (аналитическая чувствительность) и диапазон измерения

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для амплификации	Предел обнаружения, копий/мл	Диапазон измерения, копий/мл
Плазма крови	1000	ПЦР-комплект» вариант FRT-LA, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L	25	40 – 10 000 000

Данные значения характеристик определены с помощью стандартного образца предприятия, аттестованного относительно стандарта NIBSC, и достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала», «Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК» и «Экстракция РНК из исследуемых образцов».

В случае необходимости получения результатов в Международных Единицах измерения (МЕ/мл), результаты, измеренные в копиях/мл, необходимо пересчитать, учитывая соотношение $1 \text{ МЕ ВИЧ-1} = 0,58 \text{ копий}^1$.

Неопределенность измерения

Неопределенность измерения оценивалась с помощью тестирования стандартного образца предприятия, аттестованного относительно стандарта NIBSC. В таблице 3 представлены средние значения для всех вариантов ПЦР-исследования, указанных в настоящей инструкции по применению.

¹ Согласно WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-seventh report (WHO technical report series; no. 1004) ISSN 0512-3054 и WHO International Standard 3rd HIV-1 International Standard NIBSC code: 10-152.

Таблица 3

Истинное значение концентрации, lg копий/мл	Количество повторов	Среднее полученное значение концентрации, lg копий/мл	Отклонение среднего полученного значения от истинного, lg копий/мл	Среднее стандартное отклонение (SD) между полученными значениями концентрации, lg копий/мл	
				внутри одной постановки	по всем постановкам
7,23	19	7,25	0,02	0,10	0,11
4,15	85	4,09	0,06	0,09	0,14
2,15	77	2,10	0,05	0,09	0,16
1,60	51	1,60	0,00	0,23	0,32

Результаты измерений, полученные с помощью набора реагентов могут отличаться от истинных не более чем на **0,25 lg копий/мл** – для образцов, концентрация РНК ВИЧ-1 в которых более 80 копий/мл, и не более чем на **0,50 lg копий/мл** – для образцов, концентрация РНК ВИЧ-1 в которых менее или равна 80 копий/мл.

Аналитическая специфичность

Набор реагентов выявляет РНК ВИЧ-1 различных субтипов. Были исследованы образцы различных субтипов ВИЧ-1 группы М, N и О из панелей генотипов ВИЧ-1 (HIV-1 Genotype panel NIBSC code: 08/358; 2nd WHO International Reference Panel Preparation for HIV-1 Subtypes for NAT (Main) NIBSC code: 12/22). Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК/РНК следующих микроорганизмов/вирусов, потенциально способных оказать воздействие на работу набора реагентов: *HAV* (вирус гепатита А), *HBV* (вирус гепатита В), *HCV* (вирус гепатита С), *HDV* (вирус гепатита D), *HEV* (вирус гепатита Е), *CMV* (цитомегаловирус), *EBV* (вирус Эпштейна-Барр), *HSV 1*, *HSV 2* (вирус простого герпеса типы 1, 2), *VZV* (вирус ветряной оспы), *HHV 6*, *HHV 8* (вирус герпеса человека типы 6, 8), *B19* (парвовирус В19), *TBEV* (вирус клещевого энцефалита), *WNV* (вирус лихорадки западного Нила), *HAdV 2*, *HAdV 3*, *HAdV 7* (аденовирус типы 2, 3, 7), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных организмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Повторяемость, воспроизводимость и правильность

Повторяемость и воспроизводимость были определены при тестировании клинического образца, содержащего РНК ВИЧ-1 в концентрации 10200 копий/мл (4,01 lg копий/мл). Концентрация клинического образца была определена с помощью

набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT» (ПУ ФСР 2008/02552) и принята в данном эксперименте за истинную. Условия повторяемости включали в себя тестирование идентичного объекта испытаний в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование идентичного объекта испытаний в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования.

Правильность работы набора реагентов была определена при тестировании разведения стандартного образца предприятия, содержащего РНК ВИЧ-1 в концентрации 14000 копий/мл (4,15 lg копий/мл).

Таблица 4

Повторяемость

Вариант ПЦР-исследования	Истинная концентрация ВИЧ-1, lg копий/мл	Количество повторов	Полученное значение для каждой формы			Среднее для всех форм		
			Среднее значение концентрации, lg копий/мл	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %	Среднее значение концентрации, lg копий/мл	SD	CV, %
АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	4,01	20	3,90	0,10	2,56	3,99	0,10	2,44
АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2		20	4,05	0,06	1,48			
АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3		20	4,13	0,15	3,63			
АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4		20	3,86	0,08	2,07			

Таблица 5

Воспроизводимость

Вариант ПЦР-исследования	Истинная концентрация ВИЧ-1, lg копий/мл	Количество повторов	Полученное значение для каждой формы			Среднее для всех форм		
			Среднее значение концентрации, lg копий/мл	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %	Среднее значение концентрации, lg копий/мл	SD	CV, %
АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	4,01	40	3,90	0,08	2,05	4,00	0,14	3,55
АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2		40	4,02	0,10	2,49			
АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3		40	4,06	0,17	4,19			
АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4		40	4,03	0,22	5,46			

Таблица 6

Правильность

Вариант ПЦР-исследования	Истинная концентрация ВИЧ-1 (опорное значение), lg копий/мл	Количество повторов	Полученное значение для каждой формы		Среднее для всех форм	
			Среднее значение измерения, lg копий/мл	Систематическая погрешность (В), %	Среднее значение измерения, lg копий/мл	В, %
АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	4,15	48	4,26	2,65	4,19	2,42
АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2		48	4,15	1,21		
АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3		48	4,05	2,41		
АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4		48	4,29	3,39		

Оценка возможности получения ложноотрицательных и ложноположительных результатов

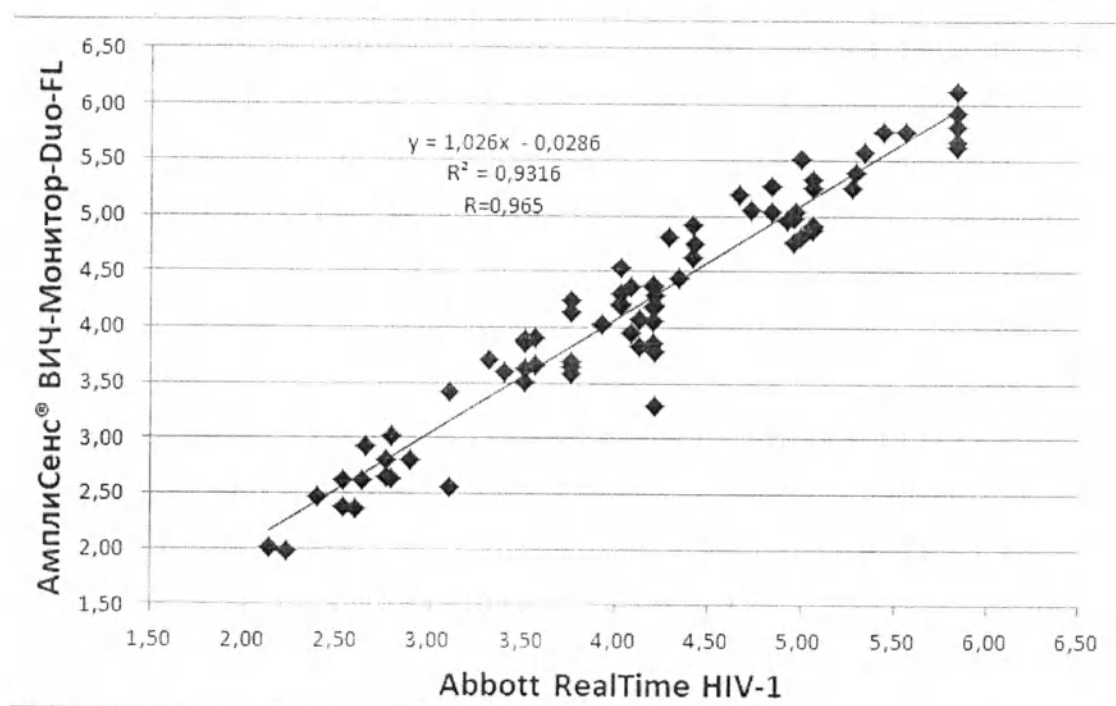
Для оценки возможности получения ложноотрицательного результата было протестировано 125 серопозитивных на ВИЧ-1 образцов плазмы крови². Ни для одного образца не был получен ложноотрицательный результат.

Для оценки возможности получения ложноположительного результата было протестировано 105 серонегативных на ВИЧ-1 образцов плазмы крови³. Ни для одного образца не был получен ложноположительный результат.

Корреляция значений концентрации РНК ВИЧ-1 со значениями, полученными с помощью других наборов реагентов

На этапе разработки было проанализировано 78 биологических образцов, содержащих РНК ВИЧ-1 в концентрации от 676 000 до 135 копий/мл (от 5,83 до 2,13 lg копий/мл). Корреляция значений концентрации РНК ВИЧ-1 (в lg копий/мл), полученных с помощью наборов реагентов «Abbott RealTime HIV-1» (РУ ФСЗ 2008/01688) и АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, представлена на рисунке 1.

Рисунок 1

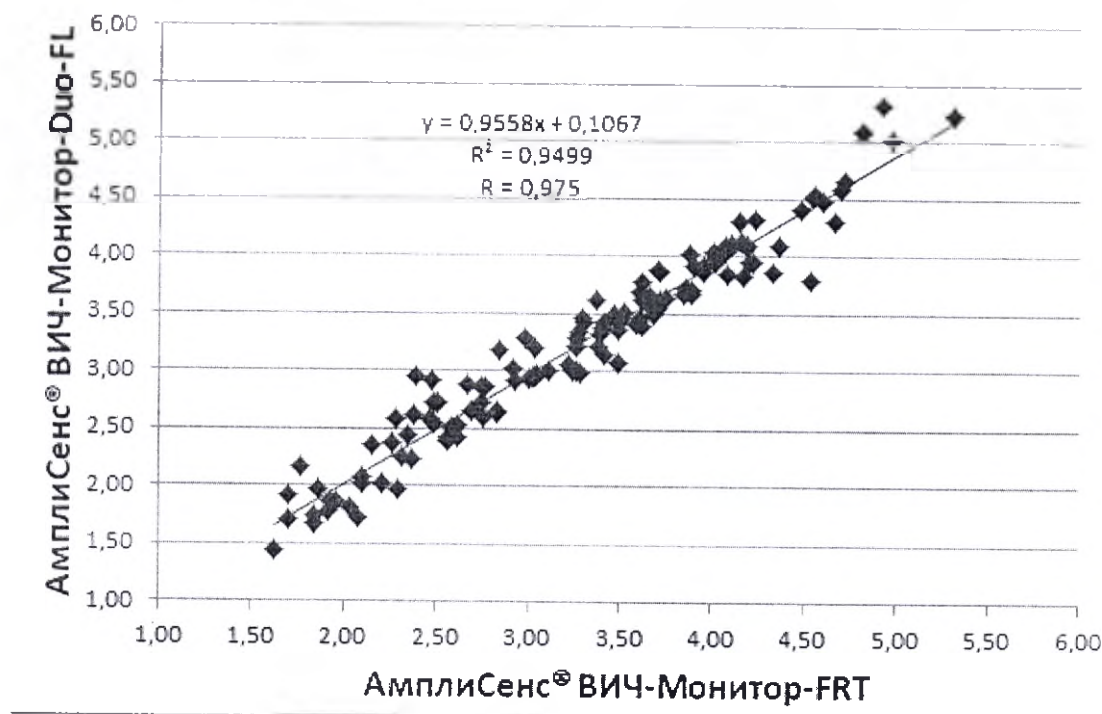


² В качестве метода сравнения использовался набор реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT» (РУ ФСР 2008/02552).

³ В качестве метода сравнения использовался набор реагентов «АмплиСенс® HCV/HBV/HIV-FL» (РУ ФСР 2009/06187).

На этапе клинических испытаний было проанализировано 125 биологических образцов, содержащих РНК ВИЧ-1 в концентрации от 204 500 до 42 копий/мл (от 5,31 до 1,62 lg копий/мл). Корреляция значений концентрации РНК ВИЧ-1 (в lg копий/мл), полученных с помощью наборов реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT» (РУ ФСР 2008/02552) и АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, представлена на рисунке 2.

Рисунок 2



МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических 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».

ВНИМАНИЕ! Растворитель, восстановленные калибраторы и контроли содержат материалы животного происхождения.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы, а также реагент Растворитель, восстановленные калибраторы и контроли, 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, 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 однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁴, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями 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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром⁵. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

⁴ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г, кроме реагентов Растворитель, восстановленных калибраторов и контролей. Растворитель, восстановленные калибраторы и контроли относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

⁵ Для удаления надсадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека:

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,

- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека (для всех форм комплектации):

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Система вакуумного забора крови (например, Vacuette®, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия, или аналогичная), включающая пробирки с K₂ЭДТА или K₃ЭДТА.
2. Центрифуга с охлаждением до 24 тыс g (например, Hettish, Германия, или аналогичная).
3. Центрифуга медицинская с принадлежностями (например, MPW Med.instruments Spółdzielnia Pracy («МПВ Мед.инструментс Сполдзиелния Праци»), Польша или аналогичная).
4. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Экстракция РНК из исследуемых образцов

При работе с формами 1 и 2, включающими комплект реагентов «РИБО-преп»:

5. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
8. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
9. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
10. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью

центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичные).

11. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

12. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, или аналогичный).

13. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).

14. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

15. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

16. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

17. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

При работе с формами 3 и 4, включающими комплект реагентов «МАГНО-сорб»:

18. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

19. Закручивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

20. Одноразовые полипропиленовые или полистирольные пробирки объемом до 5 мл диаметром 12 мм, круглодонные (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

21. Одноразовые полипропиленовые крышки для пробирок объемом до 5 мл диаметром 12 мм (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

22. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл, до 1000 мкл и до 5000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

23. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

24. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и/или 5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

25. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
26. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
27. Термостат для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм от 25 до 100 °С (например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).
28. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).
29. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и/или объемом 5 мл, диаметром 12 мм (например, Promega («Промега»), США, или аналогичные).
30. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», Россия, или аналогичный).
31. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
32. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
33. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
34. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот. – при работе с формами 3 и 4:

35. Автоматическая станция для экстракции НК «открытого типа»⁶ (например, Xiril Neon 100 series, Tecan Schweiz AG («Тикан Швейц АГ»), Швейцария) и другие, рекомендованные Производителем).
 36. Набор необходимых расходных материалов к данным автоматическим станциям.
- Обратная транскрипция, амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации**
37. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-LA:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»),

⁶ Станции, совместимые с наборами реагентов различных производителей.

- США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
- в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
38. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
39. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
40. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
41. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
42. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
43. Программируемый амплификатор роторного или планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Производителем).
44. ПО для автоматической обработки результатов, зарегистрированное в установленном порядке.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат образцы плазмы крови.

Плазма крови

Взятие крови проводится утром натощак в пробирку с калия ЭДТА (K_2 ЭДТА или K_3 ЭДТА) в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают и хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 6 ч. Пробирку с цельной кровью центрифугируют 20 мин при 800 - 1600 g при комнатной температуре. Полученную плазму переносят в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 2,0 мл.

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается транспортирование плазмы крови при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы плазмы крови:

- не требуют предварительной подготовки при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000.
- требуют предварительной подготовки при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» вариант 100 (см. Приложение А).

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для исследования не пригодны образцы плазмы крови, полученные из образцов крови, взятой в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

Для контроля эффективности экстракции РНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (плазма крови), используемом для исследования. Были протестированы образцы плазмы крови без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, значительно превышающих верхнюю границу нормальной концентрации этих веществ в плазме крови. Анализу подвергались как образцы, свободные от ВИЧ-1, так и разведение стандартного образца предприятия, содержащее РНК ВИЧ-1 в концентрации 1000 копий/мл (3,00 lg копий/мл) (табл. 7).

Таблица 7

Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация	Вариант ПЦР-исследования	Наличие интерференции
Гемоглобин	5 г/л (верхняя граница нормы 1 г/л)	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4	Не обнаружено
Триглицериды	37 ммоль/л (верхняя граница нормы 3,7 ммоль/л)	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4	Не обнаружено
Билирубин	210 мкмоль/л (верхняя граница нормы 21 мкмоль/л)	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4	Не обнаружено
Белок	120 г/л (верхняя граница нормы 85 г/л)	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4	Не обнаружено

Для оценки влияния экзогенных веществ (антикоагулянтов) были протестированы ВИЧ-негативные и ВИЧ-позитивные образцы плазмы, полученные из крови, забранной в пробирки с К₂ЭДТА и К₃ЭДТА в качестве антикоагулянтов (табл. 8). Концентрация антикоагулянтов соответствовала требованиям ГОСТ Р 53079.4-2008⁷.

Таблица 8

Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация	Вариант ПЦР-исследования	Наличие интерференции
К ₂ ЭДТА	до 2,0 мг/мл	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4	Не обнаружено
К ₃ ЭДТА	до 2,0 мг/мл	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3	Не обнаружено
		АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4	Не обнаружено

⁷ В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калий ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл.

Для оценки потенциальной интерференции лекарственных препаратов, применяемых при терапии ВИЧ-инфекции и оппортунистических инфекций, были исследованы образцы плазмы крови, полученные от лиц, больных ВИЧ-инфекцией, принимающих средства антиретровирусной терапии и с подавленной вирусной нагрузкой (ниже 20 копий/мл)⁸. Анализу подвергались как сами образцы, так и приготовленные на них разведения стандартного образца предприятия, содержащие РНК ВИЧ-1 в концентрации 1000 копий/мл (3,00 lg копий/мл) (табл. 9).

Таблица 9

Схема терапии (доза каждого препарата)	Вариант ПЦР-исследования	Наличие интерференции
Тенофовир (300 мг/сут) + Ламивудин (300 мг/сут) + Эфавиренз (600 мг/сут)	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4	Не обнаружено
Фосфазид (800 мг/сут) + Ламивудин (300 мг/сут) + Лопинавир/ритонавир (800/200 мг/сут)	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4	Не обнаружено
Абакавир (600 мг/сут) + Ламивудин (300 мг/сут) + Долутегравир (50 мг/сут)	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4	Не обнаружено
Зидовудин (600 мг/сут) + Ламивудин (300 мг/сут) + Ралтегравир (800 мг/сут)	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4	Не обнаружено
Азитромицин (500 мг/сут)	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4	Не обнаружено
Валацикловир (2 г/сут)	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 1	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 2	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 3	Не обнаружено
	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, форма 4	Не обнаружено

⁸ В качестве метода сравнения использовался набор реагентов «АмплиСенс® HCV/HBV/HIV-FL» (РУ ФСР 2009/06187).

СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100 для экстракции ДНК/РНК из биологического материала. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ⁹	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

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию ДНК/РНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав форм 1 и 2.

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 для экстракции ДНК/РНК из биологического материала. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная жидкость от бесцветного до желтого или розового цвета ¹⁰	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная жидкость от бесцветного до желтого или розового цвета ¹⁰	60	4 флакона
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона
Магнетизированная силика	Суспензия от коричневого до черного цвета	0,9	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	12 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию ДНК/РНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав форм 3 и 4.

⁹ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

¹⁰ При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб и раствора для отмывки 5 при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента кДНК вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в количественном формате.

Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,4	4 пробирки
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Смесь ОТ-ПЦР-ферментов	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
Восстановитель ферментов	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
K1L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
K2L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
ПКО1L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
ПКО2L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
ВКОЛ	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
Растворитель	Прозрачная жидкость от соломенно-желтого цвета до бесцветного (допускается появление осадка в виде хлопьев)	5,0	5 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли и калибраторы. Входит в состав форм 1 и 3.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента кДНК иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь ВИЧ-Duo-Lyo	Порошок белого цвета	-	96 пробирок объемом 0,2 мл
K1L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки

СОСТАВ

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
K2L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
ПКО1L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
ПКО2L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
BKOL	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
Растворитель	Прозрачная жидкость от соломенно-желтого цвета до бесцветного (допускается появление осадка в виде хлопьев)	5,0	5 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли и калибраторы. Входит в состав форм 2 и 4.

Программное обеспечение АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo версия 1.0 и руководство оператора.

Дата выпуска ПО: 20.08.18

Класс безопасности ПО: Класс А (невозможны никакие травмы и ущерб здоровью) в соответствии с п.4.3 ГОСТ Р МЭК 62304.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Для экстракции, используются следующие комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» вариант 100 в соответствии с приложением А.
- «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 в соответствии с приложением Б.

Каждая индивидуальная постановка должна сопровождаться постановкой трёх контролей: отрицательного контроля (ОК) и двух положительных контролей (ПК1 и ПК2). В качестве отрицательного контроля (ОК) используют реагент **Растворитель**, в качестве положительных контролей (ПК1, ПК2) используют восстановленные реагенты **ПКО1L ВИЧ-Duo** и **ПКО2L ВИЧ-Duo**.

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии восстановленного внутреннего контрольного образца – **ВКОЛ**.

При первом использовании набора реагентов необходим анализ дополнительных образцов – калибраторов **K1L ВИЧ-Duo** и **K2L ВИЧ-Duo** – минимум в трех повторах каждый (рекомендуется по четыре повтора), начиная с этапа экстракции. Процедура экстракции калибраторов аналогична процедуре экстракции исследуемых образцов.

При получении достоверных результатов калибровки полученные параметры калибровочной прямой и рассчитанное значение медианы Ct ВКО_{мед} могут быть использованы в последующих постановках для расчета концентрации РНК ВИЧ-1 в исследуемых образцах.

ВНИМАНИЕ! Калибровку необходимо проводить при изменении условий постановки или через каждые 6 месяцев использования одной серии набора реагентов в одинаковых условиях. Под условиями постановки подразумеваются: серия

комплекта для экстракции, объем экстракции, прибор для амплификации, версия программного обеспечения прибора.

Подготовка лиофилизированных контролей и калибраторов

1. Достать лиофилизированные реагенты ВКОЛ, ПКО1L ВИЧ-Duo и ПКО2L ВИЧ-Duo, К1L ВИЧ-Duo, К2L ВИЧ-Duo. Содержимое пробирок осадить на вортексе, аккуратно открыть крышки, избегая распыления содержимого, и добавить реагент Растворитель в соответствии с таблицей:

Таблица 10

Название контроля	Добавить реагент Растворитель, мкл
ПКО1L ВИЧ-Duo	1200
ПКО2L ВИЧ-Duo	1200
К1L ВИЧ-Duo	1200
К2L ВИЧ-Duo	1200
ВКОЛ	300

2. Плотнo закрыть пробирки и оставить их на 2 мин при температуре от 18 до 25 °С, периодически перемешивая на вортексе.
3. После полного растворения осадить содержимое пробирок на вортексе в течение 3-5 с для сброса капель с крышки.

ВНИМАНИЕ! Восстановленные реагенты ВКОЛ, ПКО1L ВИЧ-Duo и ПКО2L ВИЧ-Duo, К1L ВИЧ-Duo, К2L ВИЧ-Duo хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Подготовка пробирок для обратной транскрипции и амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-LA (формы 1 и 3)

Выбор пробирок для проведения ОТ-ПЦР зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб РНК и контрольных образцов

используются одноразовые наконечники с фильтрами.

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

1. Определить по схеме приготовления реакционных смесей (Приложение В) количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **15 мкл ПЦР-смеси-FL ВИЧ-Duo**, **10 мкл ПЦР-буфера-В** и **2 мкл восстановленной Смеси ОТ-ПЦР-ферментов**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (три контрольных образца в одном повторе при каждой постановке, два калибратора в трех или четырех повторах в случае проведения калибровки) плюс запас на одну реакцию.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-ПЦР.

2. Перемешать на вортексе содержимое нелиофилизированных реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В пробирку со **Смесью ОТ-ПЦР-ферментов** добавить **60 мкл Восстановителя ферментов**. Тщательно перемешать смесь **пипетированием** и осадить капли с крышки пробирки на вортексе. Приготовленная смесь хранится при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 3 месяцев.
4. Затем в отдельной одноразовой пробирке смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL ВИЧ-Duo**, **ПЦР-буфера-В** и восстановленной **Смеси ОТ-ПЦР-ферментов**. Тщательно перемешать смесь и осадить капли на вортексе.
5. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 8).
6. Внести в каждую пробирку по **25 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
7. В подготовленные пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! При использовании амплификаторов планшетного типа после добавления пробы РНК содержимое пробирки необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

8. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль (ПК1)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО1L ВИЧ-Duo**.
- б) **положительный контроль (ПК2)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО2L ВИЧ-Duo**.
- в) **отрицательный контроль (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **Растворителя**.
- г) **калибратор K1** – в 3 или 4 пробирки с реакционной смесью внести **25 мкл** проб, экстрагированных из **K1L ВИЧ-Duo** (в случае проведения калибровки).
- д) **калибратор K2** – в 3 или 4 пробирки с реакционной смесью внести **25 мкл** проб, экстрагированных из **K2L ВИЧ-Duo** (в случае проведения калибровки).

ВНИМАНИЕ! При подозрении на контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** реагента, в котором проводится элюция РНК (либо деионизированную воду).

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы.

Подготовка пробирок для обратной транскрипции и амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L (формы 2 и 4)

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

Общий объем реакционной смеси – 50 мкл, включая объем пробы РНК – 50 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью ВИЧ-Duo-Lyo** для проведения ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 3).
2. В подготовленные пробирки внести по **50 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! При использовании амплификаторов планшетного типа после

добавления пробы РНК содержимое пробирки необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

3. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль (ПК1)** – в пробирку с реакционной смесью внести **50 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО1L ВИЧ-Duo**.
- б) **положительный контроль (ПК2)** – в пробирку с реакционной смесью внести **50 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО2L ВИЧ-Duo**.
- в) **отрицательный контроль (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **50 мкл** пробы, экстрагированной из **Растворителя**.
- г) **калибратор K1** – в 3 или 4 пробирки с реакционной смесью внести **50 мкл** проб, экстрагированных из **K1L ВИЧ-Duo** (в случае проведения калибровки).
- д) **калибратор K2** – в 3 или 4 пробирки с реакционной смесью внести **50 мкл** проб, экстрагированных из **K2L ВИЧ-Duo** (в случае проведения калибровки).

ВНИМАНИЕ! При подозрении на контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **50 мкл** реагента, в котором проводится элюция РНК (либо деионизированную воду).

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы.

Проведение обратной транскрипции и амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 11 и 12).

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Таблица 11

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала
«ВИЧ-Монитор-Duo-FL» для приборов роторного¹¹ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	10 с		5
	52	20 с		
	72	30 с		
4	95	10 с		40
	55	20 с	FAM, JOE, ROX	
	72	30 с		

Таблица 12

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала
«ВИЧ-Монитор-Duo-FL» для приборов планшетного¹² типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	10 с		5
	52	20 с		
	72	30 с		
4	95	10 с		40
	55	30 с	FAM, JOE, ROX	
	72	30 с		

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

¹¹ Например, Rotor-Gene Q (QiAGEN) и другие, рекомендованные Производителем.

¹² Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Производителем.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

Анализ и интерпретация результатов

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 3 каналам:

Таблица 13

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	кДНК ВКО	кДНК ВИЧ-1	кДНК ВИЧ-1
Область амплификации	Генно-инженерный конструкт	Область гена <i>pol</i>	5'UTR

Анализ полученных результатов проводят вручную, с помощью приведенного ниже алгоритма, или автоматически, с помощью программного обеспечения АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo версия 1.0 или другого ПО, зарегистрированного в установленном порядке. Порядок работы с ПО АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo версия 1.0 описан в руководстве оператора.

Для анализа и интерпретации результатов, включая построение калибровочных прямых, используют значения порогового цикла (C_t), полученные на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Перед построением калибровочных прямых проводится корректировка значений C_t (вводятся поправки). На основании сопоставления C_t значений по каналам детекции для калибраторов (с известной концентрацией РНК ВИЧ-1 в Ig копий в мл) со значениями C_t исследуемых и контрольных образцов производится расчет РНК ВИЧ-1 в образцах и контролях. При расчете концентрации РНК ВИЧ-1 учитываются результаты амплификации по двум независимым областям амплификации генома ВИЧ-1.

1. Перед построением калибровочной прямой проводится расчет медианы значений C_t для ВКО ($C_t \text{ ВКО}_{\text{мед}}$) по значениям C_t ВКО калибраторов в постановке (канал для флуорофора FAM). Значение $C_t \text{ ВКО}_{\text{мед}}$ не должно превышать граничного значения, указанного во вкладыше к-набору реагентов.
2. Для значений C_t калибраторов (для каждого повтора) оценить необходимость введения поправки и ее величину (ΔC_t калибратора) по каналам для флуорофоров

JOE и ROX.

Для этого необходимо рассчитать по формуле ΔCt калибратора:

$\Delta Ct_{\text{калибратора}} = Ct_{\text{ВКО}_{\text{мед}}} - Ct_{\text{ВКО}_{\text{калибратора}}}$, где

$Ct_{\text{ВКО}_{\text{мед}}}$ – медиана значений $Ct_{\text{ВКО}}$.

$Ct_{\text{ВКО}_{\text{калибратора}}}$ – значение $Ct_{\text{ВКО}}$ (канал для флуорофора FAM) для данного калибратора.

- а) Если $|\Delta Ct_{\text{калибратора}}| \leq 0.85$, то поправка для Ct по каналам для флуорофоров JOE и ROX не вводится, т.е. «истинные» значения Ct ($Ct_{\text{истинное JOE/ROX}_{\text{калибратора}}}$) равны полученным в ходе постановки значениям Ct калибраторов по каналам для флуорофоров JOE и ROX ($Ct_{\text{JOE/ROX}_{\text{калибратора}}}$).
 - б) Если $-3 < \Delta Ct_{\text{калибратора}} < -0.85$, то «истинные» значения Ct , вычисляются по формуле: $Ct_{\text{истинное JOE/ROX}_{\text{калибратора}}} = Ct_{\text{JOE/ROX}_{\text{калибратора}}} + 0.85 + \Delta Ct_{\text{калибратора}}$
 - в) Если $0.85 < \Delta Ct_{\text{калибратора}} < 3$ то, «истинные» значения Ct , вычисляются по формуле: $Ct_{\text{истинное JOE/ROX}_{\text{калибратора}}} = Ct_{\text{JOE/ROX}_{\text{калибратора}}} - 0.85 + \Delta Ct_{\text{калибратора}}$
 - г) Если $|\Delta Ct_{\text{калибратора}}| \geq 3$, то данный повтор калибратора исключается из дальнейших расчетов, а $Ct_{\text{ВКО}_{\text{мед}}}$ пересчитывается заново без учета исключенного повтора.
3. Для значений Ct исследуемых и контрольных образцов также требуется оценить необходимость введения поправки и ее величину (ΔCt) по каналам для флуорофоров JOE и ROX

Для этого необходимо рассчитать по формуле

$\Delta Ct = Ct_{\text{ВКО}_{\text{мед}}} - Ct_{\text{ВКО}_{\text{образца/контроля}}}$, где

$Ct_{\text{ВКО}_{\text{мед}}}$ – медиана значений $Ct_{\text{ВКО}}$.

$Ct_{\text{ВКО}_{\text{образца/контроля}}}$ – значение $Ct_{\text{ВКО}}$ (канал для флуорофора FAM) для данного исследуемого/контрольного образца.

- а) Если $|\Delta Ct| \leq 1$, то поправка для Ct по каналам для флуорофоров JOE и ROX не вводится, т.е. «истинные» значения Ct ($Ct_{\text{истинное JOE/ROX}}$) равны полученным в ходе постановки значениям Ct для данного исследуемого/контрольного образца по каналам для флуорофоров JOE и ROX ($Ct_{\text{JOE/ROX}}$).
- б) Если $-3 < \Delta Ct < -1$, то «истинные» значения Ct , вычисляются по формуле:
 $Ct_{\text{истинное JOE/ROX}} = Ct_{\text{JOE/ROX}} + 1 + \Delta Ct$
- в) Если $1 < \Delta Ct < 3$ то, «истинные» значения Ct , вычисляются по формуле:
 $Ct_{\text{истинное JOE/ROX}} = Ct_{\text{JOE/ROX}} - 1 + \Delta Ct$

- г) Если $|\Delta Ct| \geq 3$, то расчет концентрации для данного исследуемого/контрольного образца не проводится, т.к. данный результат считается невалидным.
4. На основании $Ct_{\text{истинное JOE/ROX}}$ всех повторов калибраторов K1, K2 и их заданных концентраций (в lg копий/мл, во вкладыше к набору реагентов) по каждому из каналов для флуорофоров JOE и ROX независимо необходимо построить график калибровки, где по оси X откладываются значения концентрации в lg копий/мл, а по оси Y – значения $Ct_{\text{истинное JOE/ROX}}$.
5. Затем необходимо определить уравнение калибровочной прямой, коэффициент корреляции (R^2)¹³ и эффективность амплификации (E).

Уравнение калибровочной прямой имеет вид:

$$y = mx + b, \text{ где}$$

m — тангенс угла наклона прямой,

b — смещение калибровочной прямой.

Величина R^2 вычисляется по формуле:

$$R^2 = (r_{xy})^2$$

$$r_{xy} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \times \sum(y_i - \bar{y})^2}}, \text{ где}$$

x_i — значения $Ct_{\text{истинное JOE/ROX}}$ каждого повтора калибраторов K1 и K2;

y_i — десятичный логарифм концентрации каждого повтора калибраторов K1 и K2 (заданное во вкладыше к набору реагентов);

$\bar{x}$ — среднее арифметическое $Ct_{\text{истинное JOE/ROX}}$ для всех повторов калибраторов K1 и K2;

$\bar{y}$ — среднее арифметическое логарифмов концентрации всех повторов калибраторов K1 и K2.

На основе уравнения калибровочной прямой проводится вычисление эффективности амплификации (E) по следующей формуле:

$$E = 10^{(-1/m)} - 1.$$

Калибровка считается достоверной, если E укладывается в диапазон 0,80-1,20, а R^2 не менее 0,95.

¹³ При использовании для расчетов Microsoft® Excel функцию графика калибровки выполняет точечная диаграмма, где по оси X задаются значения концентрации (в lg копий/мл), а по оси Y – значения Ct каждого повтора калибратора. Функцию калибровочной прямой выполняет линия тренда графика калибровки. Уравнением калибровочной прямой является уравнение линии тренда. При использовании для расчетов Microsoft® Excel уравнение калибровочной прямой и величина R^2 вычисляются и выводятся на график калибровки автоматически (см. настройки формата линии тренда).

Если калибровка по каналам для флуорофоров JOE и ROX удовлетворяет указанным выше требованиям, то графики калибровки и уравнения калибровочных прямых для обоих каналов могут быть использованы для расчета концентрации РНК ВИЧ-1 и анализа результатов в течение 6 мес. Для этого каждую следующую постановку необходимо проводить:

- на одном приборе амплификации с применением одной версии программного обеспечения прибора;
- используя одну серию комплекта для экстракции и один объем экстракции;
- используя одну серию ПЦР-комплекта.

При этом значения Ct ВКО_{мед.}, m , b не меняются и используются для оценки каждой последующей постановки и расчета концентрации исследуемых и контрольных образцов по величине Ct для двух каналов детекции.

6. На основании проведенной калибровки происходит расчет концентрации РНК (в lg копий в мл) в исследуемых образцах и положительных контролях по каждому из каналов для флуорофоров JOE и ROX ($C_{JOE/ROX}$), независимо, по формуле:

$$C_{JOE/ROX} = (b_{JOE/ROX} - Ct_{\text{истинное JOE/ROX}}) / |m|_{JOE/ROX}, \text{ где}$$

$|m|_{JOE/ROX}$ — модуль¹⁴ значения тангенса угла наклона калибровочной прямой по каналу для флуорофора JOE или ROX,

$b_{JOE/ROX}$ — смещение калибровочной прямой по каналу для флуорофора JOE или ROX,

$Ct_{\text{истинное JOE/ROX}}$ — «истинное» значение Ct по каналу для флуорофоров JOE или ROX, вычисленное с учетом поправки.

ВНИМАНИЕ! Для контрольных образцов выводится два результата подсчета концентрации РНК ВИЧ-1 в lg копий/мл (по каналам для флуорофоров JOE и ROX, независимо). Результаты достоверности контрольных образцов оцениваются согласно таблице 13 и вкладышу к набору реагентов.

7. Для исследуемых образцов проводится расчет итоговой концентрации РНК ВИЧ-1 в lg копий/мл на основании полученных значений концентраций по каналам для флуорофоров JOE и ROX следующим образом:

Вычисляется модуль разницы значений концентрации по каналам для флуорофоров JOE и ROX ($|AC_{JOE/ROX}|$).

¹⁴ При использовании для расчетов Microsoft® Excel для этого может использоваться значение функции «абсолютная величина» (ABS)

1. Если $|\Delta C_{JOE/ROX}| \leq 0,45 \lg$, то конечное значение концентрации рассчитывается как среднее значение концентрации по двум каналам по формуле:

$$(C_{JOE} + C_{ROX}) / 2$$
, где
 $C_{JOE/ROX}$ – значение концентрации, полученное по каналу для флуорофора JOE или ROX.
2. Если $0,45 < |\Delta C_{JOE/ROX}| \leq 0,6 \lg$, то конечное значение концентрации рассчитывается по формуле:

$$(C_{JOE} + C_{ROX} + 0,15) / 2$$
3. Если $|\Delta C_{JOE/ROX}| > 0,6 \lg$, то в качестве конечного значения концентрации указывается большее значение из полученных по обоим каналам.
4. Если по одному из каналов для флуорофоров JOE и ROX отсутствует сигнал, то расчет концентрации ведется по второму каналу.

В результате происходит расчет концентрации исследуемых и контрольных образцов в $\lg$ копий в мл, которая может быть пересчитана в копии в мл или же в Международные Единицы измерения в мл (МЕ/мл), учитывая соотношение $1 \text{ МЕ ВИЧ-1} = 0,58 \text{ копий}$.

ВНИМАНИЕ! При использовании комплекта для экстракции «РИБО-преп», работа с которым включает в себя обязательную процедуру ультрацентрифугирования исследуемых образцов (см. Приложение А), полученный результат концентрации РНК ВИЧ-1 для исследуемых образцов будет превышать истинное значение в 10 раз, что необходимо учитывать при интерпретации результатов.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены результаты для контрольных образцов и калибраторов в соответствии с табл. 14:

Результаты для контрольных образцов и калибраторов

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
OK	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	определено значение C_t в пределах ± 3 от рассчитанного значения C_t ВКО _{мед}	Значение C_t отсутствует	
ПК1	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР		Значение концентрации укладывается в диапазон $\pm 0,5$ lg от значения, указанного во вкладыше	
ПК2	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР		Значение концентрации укладывается в диапазон $\pm 0,5$ lg от значения, указанного во вкладыше	
K1	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР		Определено значение C_t , эффективность амплификации E укладывается в диапазон 0,80-1,20, коэффициент корреляции R^2 не менее 0,95	
K2	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР			
K- ¹⁵	ОТ-ПЦР	значение C_t отсутствует	Значение C_t отсутствует	

Таблица 15

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Заключение	Расшифровка
не обнаружено	Значение C_t по обоим каналам спецификации для РНК ВИЧ-1 отсутствует. Концентрация РНК возбудителя в образце ниже предела обнаружения. Результат интерпретируется, как РНК ВИЧ-1 не обнаружено
«менее 40 копий/мл»	РНК ВИЧ-1 выявлена, однако рассчитанная концентрация меньше диапазона измерения набора реагента. Результат интерпретируется как < 40 копий/мл
«X XXX XXX копий /мл»	Рассчитанное значение концентрации РНК ВИЧ-1 (копий/мл), находится в пределах диапазона измерения набора реагентов. Результат интерпретируется как X XXX XXX копий /мл .
более 10 000 000 копий/мл	РНК ВИЧ-1 выявлена в концентрации выше диапазона измерения набора реагента ¹⁶ . Результат интерпретируется как > 10 000 000 копий/мл
невалидный	Значение C_t по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено, но отличается более чем на 3 от рассчитанного значения C_t ВКО _{мед} . Требуется повторное ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции РНК.

¹⁵ В случае постановки отрицательного контроля ОТ-ПЦР (K-).

¹⁶ Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести исследуемый образец в Растворителе (например, в 100 раз) и повторить тестирование. Полученный при повторном тестировании результат необходимо умножить на коэффициент разведения образца (в данном примере – на 100).

ВНИМАНИЕ! При использовании комплекта для экстракции «РИБО-преп», работа с которым включает в себя обязательную процедуру ультрацентрифугирования исследуемых образцов, необходимо рассчитанное значение концентрации РНК ВИЧ-1 (копий/мл) разделить на 10.

Возможные ошибки:

1. Для одного или нескольких повторов калибраторов (K1, K2) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX отсутствует, вследствие чего происходит исключение из расчетов данных повторов, и количество повторов каждого калибратора (K1, K2), демонстрирующих достоверные результаты, становится менее 3. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения **калибраторов** в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК, включая **контрольные образцы и калибраторы**.
2. Коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0,95 и/или эффективность амплификации E менее 0,8 или более 1,20. Необходимо проверить правильность заданных концентраций **калибраторов** и правильность выбранного уровня пороговой линии в программном обеспечении прибора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК, включая **контрольные образцы и калибраторы**.
3. Рассчитанное значение C_t ВКО_{мед} при калибровке превышает граничное значение, указанное во вкладыше. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения **контрольных образцов и калибраторов** в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для **всех образцов**, начиная с этапа экстракции РНК, включая **контрольные образцы и калибраторы**.
4. Для положительного контроля экстракции (ПК1 или ПК2) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX отсутствуют или рассчитанные концентрации не укладываются в диапазон $\pm 0,5 \lg$ от значения, указанного во вкладыше. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения **контрольных образцов** в блоке амплификатора. При

повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для **всех образцов**, начиная с этапа экстракции РНК, включая **контрольные образцы**.

5. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX определено значение порогового цикла C_t . Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения **контрольного образца** в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для **всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК**, начиная с этапа экстракции РНК.
6. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла (C_t), отличающееся от рассчитанного значения C_t ВКО_{мед} более чем на 3 цикла. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения **контрольных образцов** в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для **всех образцов**, начиная с этапа экстракции РНК, включая **контрольные образцы**.
7. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX определено значение порогового цикла C_t . Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов на этапе ОТ-ПЦР. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения **контрольного образца** в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ОТ-ПЦР и детекцию для **всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК**.
8. Для исследуемого образца по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла (C_t) не определено, или отличается от рассчитанного значения C_t ВКО_{мед} более чем на 3 цикла. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения **образца** в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для **данного образца**, начиная с этапа экстракции РНК.

9. Для исследуемого образца по каналам для флуорофоров JOE и ROX не определены значения порогового цикла (C_t), значение C_t по каналу для флуорофора FAM отклоняется от рассчитанного значения C_t ВКО_{мед} более чем на 2 цикла. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения образца в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для **данного образца**, начиная с этапа экстракции РНК.
10. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую горизонтальную линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии в программном обеспечении прибора. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), необходимо повторить ПЦР-исследование для данного образца, начиная с этапа экстракции РНК.

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 в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Допускается хранение комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA без разуккомплектации при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев от даты изготовления.

Хранение.

Форма 1. Комплект реагентов «РИБО-преп» хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL ВИЧ-Duo и ПЦР-буфера-В. ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo и ПЦР-буфер-В хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo хранить в защищенном от света месте. Лиофилизированные реагенты (Смесь ОТ-ПЦР-ферментов, ВКОЛ, калибраторы K1L ВИЧ-Duo и K2L ВИЧ-Duo, контрольные образцы ПКО1L ВИЧ-Duo и ПКО2L ВИЧ-Duo) хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем. Восстановленные реагенты ВКОЛ, K1L ВИЧ-Duo, K2L ВИЧ-Duo, ПКО1L ВИЧ-Duo, ПКО2L ВИЧ-Duo хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев. Восстановленный реагент Смесь ОТ-ПЦР-ферментов хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С не более 3 месяцев

Форма 2. Комплект реагентов «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь ВИЧ-Duo-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте. Лиофилизированные реагенты (ВКОЛ, калибраторы K1L ВИЧ-Duo и K2L ВИЧ-Duo, контрольные образцы ПКО1L ВИЧ-Duo и ПКО2L ВИЧ-Duo) хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем. Восстановленные реагенты ВКОЛ, K1L ВИЧ-Duo, K2L ВИЧ-Duo, ПКО1L ВИЧ-Duo, ПКО2L ВИЧ-Duo

хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев.

Форма 3. Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 хранить при температуре от 2 до 25 °С. ПЦР-комплект» вариант FRT-LA хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL ВИЧ-Duo и ПЦР-буфера-В. ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo и ПЦР-буфер-В хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo хранить в защищенном от света месте. Лиофилизированные реагенты (Смесь ОТ-ПЦР-ферментов, ВКОЛ, калибраторы K1L ВИЧ-Duo и K2L ВИЧ-Duo, контрольные образцы ПКО1L ВИЧ-Duo и ПКО2L ВИЧ-Duo) хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем. Восстановленные реагенты ВКОЛ, K1L ВИЧ-Duo, K2L ВИЧ-Duo, ПКО1L ВИЧ-Duo, ПКО2L ВИЧ-Duo хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев. Восстановленный реагент Смесь ОТ-ПЦР-ферментов хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С не более 3 месяцев.

Форма 4. Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 хранить при температуре от 2 до 25 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь ВИЧ-Duo-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте. Лиофилизированные реагенты (ВКОЛ, калибраторы K1L ВИЧ-Duo и K2L ВИЧ-Duo, контрольные образцы ПКО1L ВИЧ-Duo и ПКО2L ВИЧ-Duo) хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем. Восстановленные реагенты ВКОЛ, K1L ВИЧ-Duo, K2L ВИЧ-Duo, ПКО1L ВИЧ-Duo, ПКО2L ВИЧ-Duo хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru ¹⁷.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России



С.А. Богдан

¹⁷ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Обратитесь к инструкции по применению



Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель



Беречь от влаги

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»

Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК

Непосредственно перед экстракцией необходимо провести ультрацентрифугирование 1 мл плазмы крови (**только** для исследуемых образцов) в течение 1 ч при скорости центрифугирования не менее 24 тыс g, при температуре от 2 до 8 °С. После остановки центрифуги **немедленно** удалить 900 мкл надосадочной жидкости и как можно скорее провести экстракцию из оставшихся 100 мкл исследуемого материала, содержащего осадок, как описано ниже. Ультрацентрифугирование проводить в пробирках с закрывающимися или завинчивающимися крышками на 1,5 мл. Для контролей и калибраторов ультрацентрифугирование не проводят.

Подготовка к проведению процедуры экстракции РНК

1. Включить термостат и установить температуру 65 °С.
2. Прогреть **раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) при температуре до 65 °С до полного растворения кристаллов.

Процедура экстракции РНК

ВНИМАНИЕ! Раствор для лизиса из данного комплекта реагентов имеет резкий запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

1. В каждую пробирку с осадком и 100 мкл надосадочной жидкости, полученными после подготовки исследуемого материала, внести по **300 мкл раствора для лизиса** и по **10 мкл** восстановленного реагента **BKOL**, используя для каждой пробирки и реагента отдельный наконечник с фильтром. Промаркировать пробирки.

*При большом объеме образцов для облегчения процедуры экстракции допускается смешивание в отдельном одноразовом флаконе **раствора для лизиса и ВКО** (из расчета на один образец 300 мкл раствора для лизиса и 10 мкл восстановленного реагента **BKOL**) с последующим внесением по **300 мкл смеси** в пробирки с исследуемыми образцами.*

2. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести по **100 мкл Растворителя**, **10 мкл** восстановленного реагента **BKOL** и **300 мкл раствора для лизиса**.

3. В пробирку положительного контроля экстракции ПК1 внести по 10 мкл восстановленного реагента **BKOL**, **300 мкл раствора для лизиса** и 100 мкл восстановленного реагента **PKO1L ВИЧ-Duo**.
4. В пробирку положительного контроля экстракции ПК2 внести по 10 мкл восстановленного реагента **BKOL**, **300 мкл раствора для лизиса** и 100 мкл восстановленного реагента **PKO2L ВИЧ-Duo**.
5. При проведении калибровки дополнительно:
В три или четыре пробирки для калибратора K1 внести по 10 мкл восстановленного реагента **BKOL**, **300 мкл раствора для лизиса** и 100 мкл восстановленного реагента **K1L ВИЧ-Duo**.
В три или четыре пробирки для калибратора K2 внести по 10 мкл восстановленного реагента **BKOL**, **300 мкл раствора для лизиса** и 100 мкл восстановленного реагента **K2L ВИЧ-Duo**.

ВНИМАНИЕ! Порядок использования контрольных образцов и калибраторов описан в разделе «Экстракция РНК из исследуемых образцов».

6. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить капли жидкости на центрифуге.
7. Содержимое пробирок прогреть **5 мин при 65 °C** в термостате, перемешать и осадить капли жидкости на вортексе.
8. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, плотно закрыть крышки, тщательно перемешать на вортексе (не менее 10 секунд для каждой пробирки).
9. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 12 тыс g** (например, 13400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf).
10. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
11. 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.
12. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1-2 мин при 12 тыс g** на микроцентрифуге.
13. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки

отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.

14. Аналогично провести одну отмывку **200 мкл раствора для отмывки 4**.

15. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре **65 °C на 5 мин** для подсушивания осадка.

16. Добавить в пробирки **РНК-буфера**:

- **50 мкл (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-LA, форма 1)**
- **70 мкл (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L, форма 2)**

17. Закрыть пробирки и перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C на 5 мин**, периодически перемешивая на вортексе.

18. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1 мин** при **12 тыс g**. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК.

РНК-пробы готовы к постановке реакции ОТ-ПЦР, которую рекомендуется проводить сразу же после получения очищенной РНК.

РНК-пробы не рекомендуется хранить дольше 30 мин при температуре от 2 до 8 °C. Допускается хранение препарата при температуре от минус 24 до минус 16 °C в течение 1 мес, при температуре не выше минус 68 °C в течение года.

ВНИМАНИЕ! Поскольку экстракция с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» включает в себя обязательную процедуру ультрацентрифугирования исследуемых образцов плазмы крови, полученный результат концентрации РНК ВИЧ-1 для исследуемых образцов будет превышать истинное значение в 10 раз, что необходимо учитывать при интерпретации результатов.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Б1. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»

ВНИМАНИЕ! Лизирующий раствор МАГНО-сорб имеет резкий запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых полипропиленовых пробирок объемом 5 мл и одноразовых крышек (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Промаркировать.
3. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл восстановленный реагент ВКОЛ, компонент А и магнетизированную силику из расчета на одну точку: **10 мкл восстановленного реагента ВКОЛ, 20 мкл компонента А и 30 мкл магнетизированной силики.** При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции РНК	Восстановленный реагент ВКОЛ, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	140	210
12	130	260	390
18	190	380	570

4. Внести в пробирки на 5 мл по **60 мкл** подготовленной смеси **восстановленного реагента ВКОЛ, компонента А и магнетизированной силики;**
5. Внести в пробирки на 5 мл по **2,6 мл** лизирующего раствора МАГНО-сорб.
6. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **1000 мкл** исследуемого образца плазмы, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром. Перемешать пипетированием и закрыть крышкой.
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **1000 мкл Растворителя.**
8. В пробирку положительного контроля экстракции ПК1 внести **1000 мкл** восстановленного реагента **ПКО1L ВИЧ-Duo.**
9. В пробирку положительного контроля экстракции ПК2 внести **1000 мкл** восстановленного реагента **ПКО2L ВИЧ-Duo.**
10. При **проведении калибровки** дополнительно:
В три или четыре пробирки для калибратора К1 внести **1000 мкл** восстановленного реагента **К1L ВИЧ-Duo.**
В три или четыре пробирки для калибратора К2 внести **1000 мкл**

восстановленного реагента **K2L ВИЧ-Duo**.

ВНИМАНИЕ! Порядок использования контрольных образцов и калибраторов описан в разделе «Экстракция РНК из исследуемых образцов».

11. Перемешать пипетированием, закрыть крышки.
12. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °C на 10 мин.**
13. Перенести пробирки в магнитный штатив на **6 мин.**
14. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надсадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 1000 мкл для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
15. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**, пробирки закрыть крышкой.
16. Отобрать необходимое количество одноразовых полипропиленовых пробирок объемом на 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции), промаркировать их.
17. Смыть магнетизированную силику со стенок осторожным перемешиванием на вортексе, а затем пипетированием. Перенести всю жидкость в приготовленные пробирки на 1,5 мл.
18. Переставить пробирки с открытыми крышками в магнитный штатив на **2 мин.**
19. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надсадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
20. Добавить в пробирки **700 мкл раствора для отмывки 5**, плотно закрыть крышки, ресуспендировать магнетизированную силику перемешиванием на вортексе. Осадить капли на вортексе и повторить п. 18-19.
21. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6**.
22. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 7**, плотно закрыть крышки, ресуспендировать магнетизированную силику перемешиванием на вортексе. Осадить капли на вортексе.
23. Переставить пробирки с открытыми крышками в магнитный штатив на **1 мин**, затем осторожно отобрать надсадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.
24. Высушить магнетизированную силику, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин.**

25. Добавить в пробирки **буфер для элюции:**

- **50 мкл (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-LA, форма 3)**
- **70 мкл (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L, форма 4)**

26. Перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат при температуре **60 °С на 5 мин**, через 2 мин перемешать на вортексе.

27. Осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив на **2 мин**. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных РНК для проведения реакции ОТ-ПЦР осуществляется, не снимая пробирок с магнитного штатива.

РНК-пробы не рекомендуется хранить дольше 30 мин при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку, допускается хранение при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 мес, при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.

Б2. Экстракция нуклеиновых кислот с помощью автоматических станций с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб».

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа»¹⁸. Экстракция нуклеиновых кислот проводится в соответствии с инструкцией по эксплуатации автоматических станций и с использованием соответствующего протокола экстракции.

Объем исследуемых образцов и контрольных образцов экстракции и калибраторов, загружаемых на борт автоматической станции, должен быть увеличен (с учетом запаса) до 1200 мкл.

ВНИМАНИЕ! Порядок использования контрольных образцов и калибраторов описан в разделе «Экстракция РНК из исследуемых образцов».

Объем ВКО – 10 мкл на один образец. При использовании автоматических станций для экстракции НК «открытого типа» (например, Neon 100 (Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария) и форм 3 и 4 рекомендуемый объем элюции – 100 мкл.

¹⁸ Станции, совместимые с наборами реагентов различных производителей.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Схема приготовления реакционных смесей при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-LA

			Объем реагентов на указанное количество исследуемых точек с запасом		
Объем реагента на одну реакцию (мкл)			15.00	10.00	2.00
Количество исследуемых образцов	Количество экстрагируемых образцов ¹⁹	Количество реакций ²⁰	ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo	ПЦР-буфер-В	Восстановленная Смесь ОТ-ПЦР-ферментов
в случае проведения калибровки набора (по 3 повтора калибраторов К1 и К2)					
1	10	11	165	110	22
2	11	12	180	120	24
3	12	13	195	130	26
4	13	14	210	140	28
5	14	15	225	150	30
6	15	16	240	160	32
7	16	17	255	170	34
8	17	18	270	180	36
9	18	19	285	190	38
10	19	20	300	200	40
11	20	21	315	210	42
12-15	21-24	22-24	Объединить содержимое пробирок		
в случае, когда калибровка набора не проводится					
7	10	11	165	110	22
8	11	12	180	120	24
9	12	13	195	130	26
10	13	14	210	140	28
11	14	15	225	150	30
12	15	16	240	160	32
13	16	17	255	170	34
14	17	18	270	180	36
15	18	19	285	190	38
16	19	20	300	200	40
17	20	21	315	210	42
18-21	21-24	22-24	Объединить содержимое пробирок		

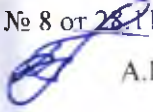
¹⁹ Количество экстрагируемых образцов = количество исследуемых образцов + контроли (ОК, ПК1, ПК2) + калибраторы в случае проведения калибровки.

²⁰ Количество реакций = количество исследуемых образцов + контроли (ОК, ПК1, ПК2) + калибраторы в случае проведения калибровки (по 3 повтора) + запас на один образец.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью 49
(сорок девять) листов (-а)
Заместитель директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора (Доверенность № 8 от 28.11.2018 г.)

"20" 03 2019 г. м.п.




А.В. Горелов

УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия
человека

В.В.Малеев

« 11 » 08 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для диагностики in vitro

АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ.....	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	10
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	12
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	15
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	19
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	19
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	19
СОСТАВ.....	20
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	23
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	23
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	24
Подготовка пробирок для обратной транскрипции и амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-LA (формы 1, 3 и 5).....	25
Подготовка пробирок для обратной транскрипции и амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L (формы 2, 4 и 6).....	26
Проведение обратной транскрипции и амплификации с детекцией в режиме «реального времени».....	27
Анализ и интерпретация результатов.....	29
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	38
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	41
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	42
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	43
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	46
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	49
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	50

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВИЧ-1	– вирус иммунодефицита человека типа 1
ВКО	– внутренний контрольный образец
K1, K2	– калибраторы
НК	– нуклеиновые кислоты
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОТ	– обратная транскрипция
ОТ-ПЦР	– полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПК1, ПК2	– положительные контроли экстракции
ПКО1, ПКО1	– положительные контрольные образцы
ПО	– программное обеспечение
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	– рибонуклеиновая кислота
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
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL, далее – набор реагентов, предназначен для количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) в биологическом материале (плазма крови) методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор выявляет ВИЧ-1 генетических групп М, N и О. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого материала.

В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которого лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется для исследования биологического материала, полученного от лиц инфицированных ВИЧ-1 вне зависимости от формы и наличия

манифестации заболевания, для мониторинга течения ВИЧ-инфекции у пациента и эффективности проводимой терапии.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускается только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО) и одновременном проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемого вируса и кДНК ВКО с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК проводится реакция обратной транскрипции с помощью фермента ТМ-ревертазы и амплификации участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Количественное определение кДНК ВИЧ-1 возможно при проведении ПЦР в режиме «реального времени» и основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией кДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). Для проведения количественного теста

экстракцию, обратную транскрипцию и амплификацию кДНК исследуемых образцов проводят одновременно с калибраторами K1, K2 и положительными контрольными образцами ПК1, ПК2, содержащими известную концентрацию РНК-мишени. Аттестация калибраторов K1, K2 и положительных контрольных образцов ПК1, ПК2 осуществляется относительно стандарта NIBSC HIV-1 RNA (3rd International standard) согласно пункту 5.5. ГОСТ ISO17511.

На этапе ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке проводятся 3 реакции – амплификация двух различных участков генома кДНК ВИЧ-1, а также амплификация последовательности кДНК ВКО. Результаты амплификации кДНК ВИЧ-1, а также кДНК ВКО регистрируются по трём различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
кДНК-мишень	кДНК ВКО	кДНК ВИЧ-1	кДНК ВИЧ-1
Область амплификации	Генно-инженерный конструкт	Область гена <i>pol</i>	5'UTR

Анализ концентрации по двум независимым областям амплификации генома ВИЧ-1 позволяет значительно снизить риск получения ложноотрицательных результатов и заниженных показателей вирусной нагрузки вследствие мутаций вируса.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Форма 3: «МАГНО-сорб» вариант 100-1000; «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA

Форма 4: «МАГНО-сорб» вариант 100-1000; «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Форма 5: «РИБО-преп» вариант 100; «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA

Форма 6: «РИБО-преп» вариант 100; «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Формы 1 и 2 предназначены для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют провести калибровку набора реагентов и выявлять РНК в количественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные Производителем.

Формы 3, 4, 5 и 6 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из биологического материала, проведение реакции

обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют провести калибровку набора реагентов и выявлять РНК в количественном формате.

Форма 1 рассчитана на проведение 110 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Форма 2 рассчитана на проведение 96 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Формы 3 и 5 рассчитаны на экстракцию и проведение 110 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Формы 4 и 6 рассчитаны на экстракцию и проведение 96 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Диапазон обнаружения и диапазон измерения

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для амплификации	Предел обнаружения, копий/мл	Диапазон измерения, копий/мл
Плазма крови	1000	ПЦР-комплект» вариант FRT-LA, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L	25	40 – 10 000 000

Данные значения характеристик определены с помощью стандартного образца предприятия, аттестованного относительно стандарта NIBSC, и достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала», «Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК» и «Экстракция РНК из исследуемых образцов».

В случае необходимости получения результатов в Международных Единицах измерения (МЕ/мл), результаты, измеренные в копиях/мл, необходимо пересчитать, учитывая соотношение 1 МЕ ВИЧ-1=0,58 копий¹.

Неопределенность измерения

Неопределенность измерения оценивалась с помощью тестирования стандартного образца предприятия, аттестованного относительно стандарта NIBSC. В таблице 3 представлены средние значения для всех вариантов ПЦР-исследования, указанных в настоящей инструкции по применению.

¹ Согласно WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-seventh report (WHO technical report series; no. 1004) ISSN 0512-3054 и WHO International Standard 3rd HIV-1 International Standard NIBSC code: 10-152.

Таблица 3

Истинное значение концентрации, Ig копий/мл	Количество повторов	Среднее полученное значение концентрации, Ig копий/мл	Отклонение среднего полученного значения от истинного, Ig копий/мл	Среднее стандартное отклонение (SD) между полученными значениями концентрации, Ig копий/мл	
				внутри одной постановки	по всем постановкам
7,23	19	7,25	0,02	0,10	0,11
4,15	85	4,09	0,06	0,09	0,14
2,15	77	2,10	0,05	0,09	0,16
1,60	51	1,60	0,00	0,23	0,32

Результаты измерений, полученные с помощью набора реагентов могут отличаться от истинных не более чем на **0,25** Ig копий/мл – для образцов, концентрация РНК ВИЧ-1 в которых более 80 копий/мл, и не более чем на **0,50** Ig копий/мл – для образцов, концентрация РНК ВИЧ-1 в которых менее или равна 80 копий/мл.

Аналитическая специфичность

Набор реагентов выявляет РНК ВИЧ-1 различных субтипов. Были исследованы образцы различных субтипов ВИЧ-1 группы M, N и O из панелей генотипов ВИЧ-1 (HIV-1 Genotype panel NIBSC code: 08/358; 2nd WHO International Reference Panel Preparation for HIV-1 Subtypes for NAT (Main) NIBSC code: 12/22). Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК/РНК следующих микроорганизмов/вирусов, потенциально способных оказать воздействие на работу набора реагентов: *HAV* (вирус гепатита А), *HBV* (вирус гепатита В), *HCV* (вирус гепатита С), *HDV* (вирус гепатита D), *HEV* (вирус гепатита Е), *CMV* (цитомегаловирус), *EBV* (вирус Эпштейна-Барр), *HSV 1*, *HSV 2* (вирус простого герпеса типы 1, 2), *VZV* (вирус ветряной оспы), *HHV 6*, *HHV 8* (вирус герпеса человека типы 6, 8), *B19* (парвовирус В19), *TBEV* (вирус клещевого энцефалита), *WNV* (вирус лихорадки западного Нила), *HAdV 2*, *HAdV 3*, *HAdV 7* (аденовирус типы 2, 3, 7), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных организмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Воспроизводимость, повторяемость и правильность

Воспроизводимость, повторяемость и правильность были определены путем тестирования модельных образцов биоматериала. Для определения воспроизводимости и повторяемости использовались разведения стандартного

образца предприятия, содержащие РНК ВИЧ-1 в концентрациях 1400 и 14000 копий/мл (3,15 и 4,15 lg копий/мл). Для определения правильности использовалось разведение стандартного образца предприятия, содержащее РНК ВИЧ-1 в концентрации 14000 копий/мл (4,15 lg копий/мл).

Таблица 4

Повторяемость

Вариант ПЦР-исследования	Истинная концентрация ВИЧ-1, lg копий/мл	Количество повторов	Полученное значение концентрации для каждой формы			Среднее для всех форм		
			Среднее значение концентрации, lg копий/мл	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %	Среднее значение концентрации, lg копий/мл	SD	CV, %
МАГНО-сорб «ПЦР-комплект» LA	4,15	8	4,14	0,16	3,86	4,10	0,11	2,68
МАГНО-сорб «ПЦР-комплект» L		8	4,07	0,05	1,23			
РИБО-преп «ПЦР-комплект» LA		8	4,06	0,08	1,97			
РИБО-преп «ПЦР-комплект» L		8	4,13	0,14	3,39			
МАГНО-сорб «ПЦР-комплект» LA	3,15	8	3,06	0,24	7,84	3,08	0,15	4,87
МАГНО-сорб «ПЦР-комплект» L		8	3,01	0,07	2,33			
РИБО-преп «ПЦР-комплект» LA		8	2,98	0,15	5,03			
РИБО-преп «ПЦР-комплект» L		8	3,28	0,13	3,96			

Таблица 5

Воспроизводимость

Вариант ПЦР-исследования	Истинная концентрация ВИЧ-1, Ig копий/мл	Количество повторов	Полученное значение концентрации для каждой формы			Среднее для всех форм		
			Среднее значение концентрации, Ig копий/мл	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %	Среднее значение концентрации, Ig копий/мл	SD	CV, %
МАГНО-сорб «ПЦР-комплект» LA	4,15	16	4,05	0,18	4,44	4,07	0,11	2,70
МАГНО-сорб «ПЦР-комплект» L		16	4,07	0,10	2,46			
РИБО-преп «ПЦР-комплект» LA		16	4,06	0,06	1,48			
РИБО-преп «ПЦР-комплект» L		16	4,10	0,11	2,68			
МАГНО-сорб «ПЦР-комплект» LA	3,15	16	3,07	0,19	6,19	3,13	0,14	4,47
МАГНО-сорб «ПЦР-комплект» L		16	3,08	0,12	3,90			
РИБО-преп «ПЦР-комплект» LA		16	3,05	0,14	4,59			
РИБО-преп «ПЦР-комплект» L		16	3,31	0,10	3,02			

Таблица 6

Правильность

Вариант ПЦР-исследования	Истинная концентрация ВИЧ-1, lg копий/мл	Количество повторов	Полученное значение концентрации для каждой формы		Среднее для всех форм	
			Среднее значение измерения, lg копий/мл	Систематическая погрешность (В), %	Среднее значение измерения, lg копий/мл	Систематическая погрешность (В), %
МАГНО-сорб «ПЦР-комплект» LA	4,15	24	3,96	4,58	4,08	1,69
МАГНО-сорб «ПЦР-комплект» L		24	4,19	0,96		
РИБО-преп «ПЦР-комплект» LA		24	4,12	0,72		
РИБО-преп «ПЦР-комплект» L		24	4,04	2,65		

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 7

Результаты тестирования набора реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL в сравнении с референтным методом

Тип образцов	Результаты применения набора реагентов АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL		Результаты применения референтного метода ²	
			положительных	отрицательных
Плазма крови	Всего исследовано 229	положительных	120	0
		отрицательных	4	105

Диагностическая чувствительность исследовалась путем тестирования 124 образцов плазмы крови. Подтверждение вирусной нагрузки в данных образцах проводилась с помощью референтного диагностического метода. Диагностическая специфичность была определена путем тестирования 105 серонегативных на ВИЧ-1 образцов плазмы крови.

² В качестве референтного метода использовался набор реагентов «Abbott RealTime HIV-1», Abbott Molecular Inc., США. (ПУ ФСЗ 2008/01688 от 24.02.2016).

Таблица 8

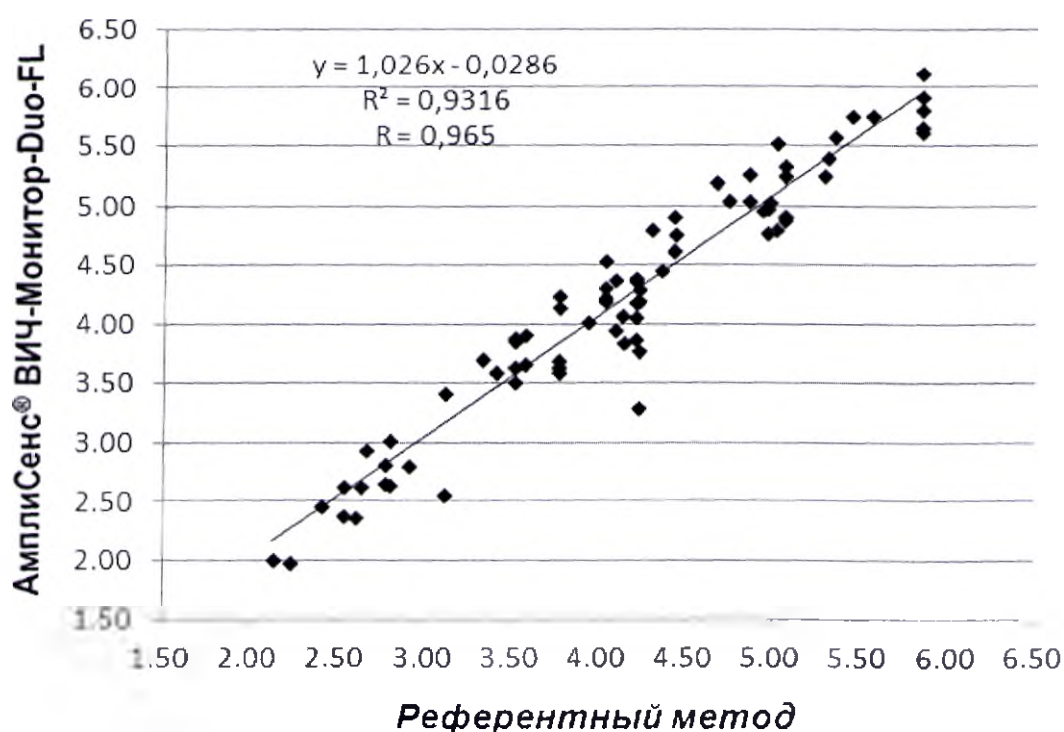
**Диагностические характеристики набора реагентов для диагностики in vitro
АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL**

Тип образцов	Диагностическая чувствительность ³ (с доверительной вероятностью 90 %), в интервале, %	Диагностическая специфичность ⁴ (с доверительной вероятностью 90 %), в интервале, %
плазма крови	94,5-100,0	98,0-100,0

Корреляция значений концентрации РНК ВИЧ-1 с референтным методом

Было проанализировано 78 биологических образцов, содержащих РНК ВИЧ-1 в концентрации от 676 000 до 135 копий/мл (от 5,83 до 2,13 lg копий/мл). Корреляция значений концентрации РНК ВИЧ-1 (в lg копий/мл), полученных с помощью референтного метода² и АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL представлены на рисунке 1.

Рисунок 1



³ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.
⁴ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических 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».

ВНИМАНИЕ! Растворитель, восстановленные калибраторы и контроли содержат материалы животного происхождения.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы, а также реагент Растворитель, восстановленные калибраторы и контроли, 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, 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 однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также

использованные реагенты, упаковку⁵, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями 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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром⁶. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

⁵ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г, кроме реагентов Растворитель, восстановленных калибраторов и контролеи. Растворитель, восстановленные калибраторы и контролеи относятся к классу опасности медицинских отходов Б

⁶ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, не включающих комплекты реагентов «МАГНО-сорб» и «РИБО-преп»):

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, включающих комплекты реагентов «МАГНО-сорб» или «РИБО-преп»):

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека (для всех форм комплектации):

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Система вакуумного забора крови (например, Vacuette®, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия, или аналогичная).
2. Центрифуга с охлаждением до 24 тыс g (например, Hettish, Германия, или аналогичная).
3. Центрифуга медицинская с принадлежностями (например, MPW Med.instruments Spoldzielnia Pracy («МПВ Мед.инструментс Сполдзиелния Праци»), Польша или аналогичная).
4. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Экстракция РНК из исследуемых образцов

При работе с формами 3 и 4. включающими комплект реагентов «МАГНО-сорб»:

5. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
6. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
7. Одноразовые полипропиленовые или полистирольные пробирки объемом до 5 мл диаметром 12 мм, круглодонные (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
8. Одноразовые полипропиленовые крышки для пробирок объемом до 5 мл диаметром 12 мм (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл, до 1000 мкл и до 5000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
11. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и/или 5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
12. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

13. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 14. Термостат для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм от 25 до 100 °C (например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).
 15. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °C (например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).
 16. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и/или объемом 5 мл, диаметром 12 мм (например, Promega, США).
 17. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», Россия, или аналогичный).
 18. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 19. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °C.
 20. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 21. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.
- При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот, – при работе с формами 3 и 4:
22. Автоматическая станция для экстракции НК «открытого типа»⁷ (например, Xiril Neon 100 series, Tecan Schweiz AG («Тикан Швейц АГ»), Швейцария) и другие, рекомендованные Производителем).
 23. Набор необходимых расходных материалов к данным автоматическим станциям.
- При работе с формами 5 и 6, включающими комплект реагентов «РИБО-преп»:
24. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 25. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 26. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 27. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 28. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

⁷ Станции, совместимые с наборами реагентов различных производителей.

29. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичные).
30. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
31. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, или аналогичный).
32. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
33. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
34. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
35. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
36. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

При работе с формами 1 и 2:

37. Комплекты реагентов для экстракции РНК, например «РИБО-преп» вариант 100 (РУ № ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 (РУ № № ФСР 2010/07265).
38. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот. – при работе с формами 1 и 2:

39. Автоматическая станция для экстракции НК «закрытого типа»⁸ (например, QIAasymphony SP/AS или QIAasymphony SP (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) и другие, рекомендованные Производителем).
40. Комплекты реагентов для экстракции РНК для автоматической станции QIAasymphony SP/AS или QIAasymphony SP (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) (например, QIAasymphony Virus/Bacteria Midi Kit (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия).
41. Одноразовые пробирки объемом 2,0 мл, рекомендованные в инструкции по запуску автоматической станции QIAasymphony SP/AS (например, Sarstedt, Германия, или аналогичные).

⁸ Станции, совместимые с наборами реагентов только одного производителя.

42. Набор необходимых расходных материалов к данной автоматической станции.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

43. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA:

- а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
- в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.

44. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

45. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

46. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

47. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

48. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

49. Программируемый амплификатор роторного или планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Производителем.

50. ПО для автоматической обработки результатов, зарегистрированное в установленном порядке.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат образцы плазмы крови.

Плазма крови

Взятие крови проводится утром натощак в пробирку с раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают и хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 6 ч. Пробирку с цельной кровью центрифугируют 20 мин при 800 - 1600 g при комнатной температуре. Полученную плазму переносят в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 2,0 мл.

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается транспортирование плазмы крови при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы плазмы крови:

- не требуют предварительной подготовки при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 и автоматической станции QIAasymphony SP/AS или QIAasymphony SP.
- требуют предварительной подготовки при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» вариант 100 (см. Приложение А).

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля эффективности экстракции РНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Для исследования не пригодны образцы плазмы крови, полученные из образцов крови, взятой в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

СОСТАВ

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 для экстракции ДНК/РНК из биологического материала. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость ⁹	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость ⁹	60	4 флакона
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона
Магнетизированная силика	Суспензия черного цвета	0,9	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	12 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию ДНК/РНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав форм 3 и 4.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100 для экстракции ДНК/РНК из биологического материала. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от голубого цвета до серого ¹⁰	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

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию ДНК/РНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав форм 5 и 6.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента кДНК вируса иммунодефицита человека 1 типа

⁹ При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб и раствора для отмывки 5 при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

¹⁰ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

(ВИЧ-1) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в количественном формате.

Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo	Прозрачная жидкость от бледно-розового цвета до светло-сиреневого	0,4	4 пробирки
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Смесь ОТ-ПЦР-ферментов	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
Восстановитель ферментов	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
K1L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
K2L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
ПКО1L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
ПКО2L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
ВКОЛ	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
Растворитель	Прозрачная жидкость от соломенно-желтого цвета до бесцветного (допускается появление осадка в виде хлопьев)	5,0	5 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли и калибраторы. Входит в состав форм 1, 3 и 5.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента «ДНК иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь ВИЧ-Duo-Lyo	Порошок белого цвета	-	96 пробирок объемом 0,2 мл
K1L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
K2L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки

СОСТАВ

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПКО1L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
ПКО2L ВИЧ-Duo	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
ВКОЛ	Порошок белого цвета	-	4 пробирки
Растворитель	Прозрачная жидкость от соломенно-желтого цвета до бесцветного (допускается появление осадка в виде хлопьев)	5,0	5 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли и калибраторы. Входит в состав форм 2, 4 и 6.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Для экстракции, используются следующие комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» вариант 100 в соответствии с приложением А.
- «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 в соответствии с приложением Б.
- QIAasympyphony Virus/Bacteria Midi Kit в соответствии с приложением В.

Каждая индивидуальная постановка должна сопровождаться постановкой трёх контролей: отрицательного контроля (ОК) и двух положительных контролей (ПК1 и ПК2). В качестве отрицательного контроля (ОК) используют реагент **Растворитель**, в качестве положительных контролей (ПК1, ПК2) используют восстановленные реагенты **ПКО1L ВИЧ-Duo** и **ПКО2L ВИЧ-Duo**.

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии восстановленного внутреннего контрольного образца – **ВКОL**.

При первом использовании набора реагентов необходим анализ дополнительных образцов - калибраторов **K1L ВИЧ-Duo** и **K2L ВИЧ-Duo** – минимум в трех повторах каждый (рекомендуется по четыре повтора), начиная с этапа экстракции. Процедура экстракции калибраторов аналогична процедуре экстракции исследуемых образцов.

При получении достоверных результатов калибровки полученные параметры калибровочной прямой и рассчитанное значение медианы Ct ВКО_{мед} могут быть использованы в последующих постановках для расчета концентрации РНК ВИЧ-1 в исследуемых образцах.

ВНИМАНИЕ! ! Калибровку необходимо проводить при изменении условий постановки или через каждые 6 месяцев использования одной серии набора реагентов в одинаковых условиях. Под условиями постановки подразумеваются: серия комплекта для экстракции, объем экстракции, прибор для амплификации, версия программного обеспечения прибора.

Подготовка лиофилизированных контролей и калибраторов

1. Достать лиофилизированные реагенты **BKOL**, **PKO1L ВИЧ-Duo** и **PKO2L ВИЧ-Duo**, **K1L ВИЧ-Duo**, **K2L ВИЧ-Duo**. Содержимое пробирок осадить на вортексе, аккуратно открыть крышки, избегая распыления содержимого, и добавить реагент **Растворитель** в соответствии с таблицей:

Таблица 9

Название контроля	Добавить реагент Растворитель, мкл
PKO1L ВИЧ-Duo	1200
PKO2L ВИЧ-Duo	1200
K1L ВИЧ-Duo	1200
K2L ВИЧ-Duo	1200
BKOL	300

2. Плотнo закрыть пробирки и оставить их на 2 мин при температуре от 18 до 25 °С, периодически перемешивая на вортексе.
3. После полного растворения осадить содержимое пробирок на вортексе в течение 3-5 с для сброса капель с крышки.

ВНИМАНИЕ! Восстановленные реагенты **BKOL**, **PKO1L ВИЧ-Duo** и **PKO2L ВИЧ-Duo**, **K1L ВИЧ-Duo**, **K2L ВИЧ-Duo** хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Подготовка пробирок для обратной транскрипции и амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-LA (формы 1, 3 и 5)

Выбор пробирок для проведения ОТ-ПЦР зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

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

1. Определить по схеме приготовления реакционных смесей (Приложение Г) количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **15 мкл ПЦР-смеси-FL ВИЧ-Duo**, **10 мкл ПЦР-буфера-В** и **2 мкл восстановленной Смеси ОТ-ПЦР-ферментов**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (три контрольных образца в одном повторе при каждой постановке, два калибратора в трех или четырех повторах в случае проведения калибровки) плюс запас на одну реакцию.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-ПЦР.

2. Перемешать на вортексе содержимое нелиофилизированных реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В пробирку со **Смесью ОТ-ПЦР-ферментов** добавить **60 мкл Восстановителя ферментов**. Тщательно перемешать смесь **пипетированием** и осадить капли с крышки пробирки на вортексе. Приготовленная смесь хранится при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 3 месяцев.
4. Затем в отдельной одноразовой пробирке смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL ВИЧ-Duo**, **ПЦР-буфера-В** и восстановленной **Смеси ОТ-ПЦР-ферментов**. Тщательно перемешать смесь и осадить капли на вортексе.
5. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 8).
6. Внести в каждую пробирку по **25 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
7. В подготовленные пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью комплектов

реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! При использовании амплификаторов планшетного типа после добавления пробы РНК содержимое пробирки необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

8. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль (ПК1)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО1L ВИЧ-Duo**.
- б) **положительный контроль (ПК2)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО2L ВИЧ-Duo**.
- в) **отрицательный контроль (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **Растворителя**.
- г) **калибратор К1** – в 3 или 4 пробирки с реакционной смесью внести **25 мкл** проб, экстрагированных из **К1L ВИЧ-Duo** (в случае проведения калибровки).
- д) **калибратор К2** – в 3 или 4 пробирки с реакционной смесью внести **25 мкл** проб, экстрагированных из **К2L ВИЧ-Duo** (в случае проведения калибровки).

ВНИМАНИЕ! При подозрении на контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** реагента, в котором проводится элюция РНК (либо деионизированную воду).

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы.

Подготовка пробирок для обратной транскрипции и амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L (формы 2, 4 и 6)

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

Общий объем реакционной смеси – 50 мкл, включая объем пробы РНК – 50 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью ВИЧ-Duo-Lyo** для проведения ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 3).
2. В подготовленные пробирки внести по **50 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! При использовании амплификаторов планшетного типа после добавления пробы РНК содержимое пробирки необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

3. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль (ПК1)** – в пробирку с реакционной смесью внести **50 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО1L ВИЧ-Duo**.
- б) **положительный контроль (ПК2)** – в пробирку с реакционной смесью внести **50 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО2L ВИЧ-Duo**.
- в) **отрицательный контроль (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **50 мкл** пробы, экстрагированной из **Растворителя**.
- г) **калибратор K1** – в 3 или 4 пробирки с реакционной смесью внести **50 мкл** проб, экстрагированных из **K1L ВИЧ-Duo** (в случае проведения калибровки).
- д) **калибратор K2** – в 3 или 4 пробирки с реакционной смесью внести **50 мкл** проб, экстрагированных из **K2L ВИЧ-Duo** (в случае проведения калибровки).

ВНИМАНИЕ! При подозрении на контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **50 мкл** реагента, в котором проводится элюция РНК (либо деионизированную воду).

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы.

Проведение обратной транскрипции и амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 10 и 11).

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Таблица 10

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала
«ВИЧ-Монитор-Duo-FL» для приборов роторного¹¹ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с		5
	52	20 с		
	72	30 с		
4	95	10 с		40
	55	20 с	FAM, JOE, ROX	
	72	30 с		

Таблица 11

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала
«ВИЧ-Монитор-Duo-FL» для приборов планшетного¹² типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с		5
	52	20 с		
	72	30 с		
4	95	10 с		40
	55	30 с	FAM, JOE, ROX	
	72	30 с		

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

¹¹ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Производителем.

¹² Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Производителем.

- По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

Анализ и интерпретация результатов

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 3 каналам:

Таблица 12

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	кДНК ВКО	кДНК ВИЧ-1	кДНК ВИЧ-1
Область амплификации	Генно-инженерный конструкт	Область гена <i>pol</i>	5'UTR

Анализ полученных результатов проводят вручную, с помощью приведенного ниже алгоритма, или автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Для анализа и интерпретации результатов, включая построение калибровочных прямых, используют значения порогового цикла (C_t), полученные на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Перед построением калибровочных прямых проводится корректировка значений C_t (вводятся поправки). На основании сопоставления C_t значений по каналам детекции для калибраторов (с известной концентрацией РНК ВИЧ-1 в Ig копий в мл) со значениями C_t исследуемых и контрольных образцов производится расчет РНК ВИЧ-1 в образцах и контролях. При расчете концентрации РНК ВИЧ-1 учитываются результаты амплификации по двум независимым областям амплификации генома ВИЧ-1.

- Перед построением калибровочной прямой проводится расчет медианы значений C_t для ВКО ($C_t \text{ ВКО}_{\text{мед}}$) по значениям C_t ВКО калибраторов в постановке (канал для флуорофора FAM). Значение $C_t \text{ ВКО}_{\text{мед}}$ не должно превышать граничного значения, указанного во вкладыше к-набору реагентов.
- Для значений C_t калибраторов (для каждого повтора) оценить необходимость введения поправки и ее величину ($\Delta C_t \text{ калибратора}$) по каналам для флуорофоров JOE и ROX.

Для этого необходимо рассчитать по формуле $\Delta Ct_{\text{калибратора}}$.

$\Delta Ct_{\text{калибратора}} = Ct_{\text{ВКО}_{\text{мед}}} - Ct_{\text{ВКО}_{\text{калибратора}}}$. где

$Ct_{\text{ВКО}_{\text{мед}}}$ – медиана значений $Ct_{\text{ВКО}}$.

$Ct_{\text{ВКО}_{\text{калибратора}}}$ – значение $Ct_{\text{ВКО}}$ (канал для флуорофора FAM) для данного калибратора.

а) Если $|\Delta Ct_{\text{калибратора}}| \leq 0.85$, то поправка для Ct по каналам для флуорофоров JOE и ROX не вводится, т.е. «истинные» значения Ct ($Ct_{\text{истинное JOE/ROX калибратора}}$) равны полученным в ходе постановки значениям Ct калибраторов по каналам для флуорофоров JOE и ROX ($Ct_{\text{JOE/ROX калибратора}}$).

б) Если $-3 < \Delta Ct < -0.85$, то «истинные» значения Ct , вычисляются по формуле:

$$Ct_{\text{истинное JOE/ROX калибратора}} = Ct_{\text{JOE/ROX калибратора}} + 0.85 + \Delta Ct_{\text{калибратора}}$$

в) Если $0.85 < \Delta Ct < 3$ то, «истинные» значения Ct , вычисляются по формуле:

$$Ct_{\text{истинное JOE/ROX калибратора}} = Ct_{\text{JOE/ROX калибратора}} - 0.85 + \Delta Ct_{\text{калибратора}}$$

г) Если $|\Delta Ct_{\text{калибратора}}| \geq 3$, то данный повтор калибратора исключается из дальнейших расчетов, а $Ct_{\text{ВКО}_{\text{мед}}}$ пересчитывается заново без учета исключенного повтора.

3. Для значений Ct исследуемых и контрольных образцов также требуется оценить необходимость введения поправки и ее величину (ΔCt) по каналам для флуорофоров JOE и ROX

Для этого необходимо рассчитать по формуле

$\Delta Ct = Ct_{\text{ВКО}_{\text{мед}}} - Ct_{\text{ВКО}_{\text{образца/контроля}}}$, где

$Ct_{\text{ВКО}_{\text{мед}}}$ – медиана значений $Ct_{\text{ВКО}}$.

$Ct_{\text{ВКО}_{\text{образца/контроля}}}$ – значение $Ct_{\text{ВКО}}$ (канал для флуорофора FAM) для данного исследуемого/контрольного образца.

а) Если $|\Delta Ct| \leq 1$, то поправка для Ct по каналам для флуорофоров JOE и ROX не вводится, т.е. «истинные» значения Ct ($Ct_{\text{истинное JOE/ROX}}$) равны полученным в ходе постановки значениям Ct для данного исследуемого/контрольного образца по каналам для флуорофоров JOE и ROX ($Ct_{\text{JOE/ROX}}$).

б) Если $-3 \leq \Delta Ct \leq -1$, то «истинные» значения Ct , вычисляются по формуле:

$$Ct_{\text{истинное JOE/ROX}} = Ct_{\text{JOE/ROX}} + 1 + \Delta Ct$$

в) Если $1 \leq \Delta Ct \leq 3$ то, «истинные» значения Ct , вычисляются по формуле:

$$Ct_{\text{истинное JOE/ROX}} = Ct_{\text{JOE/ROX}} - 1 + \Delta Ct$$

- г) Если $|\Delta Ct| \geq 3$, то расчет концентрации для данного исследуемого/контрольного образца не проводится, т.к. данный результат считается невалидным.
4. На основании $Ct_{\text{истинное JOE/ROX}}$ всех повторов калибраторов K1, K2 и их заданных концентраций (в lg копий/мл, во вкладыше к набору реагентов) по каждому из каналов для флуорофоров JOE и ROX независимо необходимо построить график калибровки, где по оси X откладываются значения концентрации в lg копий/мл, а по оси Y – значения $Ct_{\text{истинное JOE/ROX}}$.
5. Затем необходимо определить уравнение калибровочной прямой, коэффициент корреляции (R^2)¹³ и эффективность амплификации (E).

Уравнение калибровочной прямой имеет вид:

$$y = mx + b, \text{ где}$$

m — тангенс угла наклона прямой,

b — смещение калибровочной прямой.

Величина R^2 вычисляется по формуле:

$$R^2 = (r_{xy})^2$$

$$r_{xy} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{y})^2}}, \text{ где}$$

x_i — значения $Ct_{\text{истинное JOE/ROX}}$ каждого повтора калибраторов K1 и K2;

y_i — десятичный логарифм концентрации каждого повтора калибраторов K1 и K2 (заданное во вкладыше к набору реагентов);

$\bar{x}$ — среднее арифметическое $Ct_{\text{истинное JOE/ROX}}$ для всех повторов калибраторов K1 и K2;

$\bar{y}$ — среднее арифметическое логарифмов концентрации всех повторов калибраторов K1 и K2.

На основе уравнения калибровочной прямой проводится вычисление эффективности амплификации (E) по следующей формуле:

$$E = 10^{(-1/\text{логарифм})} - 1.$$

¹³ При использовании для расчетов Microsoft® Excel функцию графика калибровки выполняет точечная диаграмма, где по оси X задаются значения концентрации (в lg копий/мл), а по оси Y – значения Ct каждого повтора калибратора. Функцию калибровочной прямой выполняет линия тренда графика калибровки. Уравнением калибровочной прямой является уравнение линии тренда. При использовании для расчетов Microsoft® Excel уравнение калибровочной прямой и величина R^2 вычисляются и выводятся на график калибровки автоматически (см. настройки формата линии тренда).

Калибровка считается достоверной, если E укладывается в диапазон 0,80-1,20, а R^2 не менее 0,95.

Если калибровка по каналам для флуорофоров JOE и ROX удовлетворяет указанным выше требованиям, то графики калибровки и уравнения калибровочных прямых для обоих каналов могут быть использованы для расчета концентрации РНК ВИЧ-1 и анализа результатов в течение 6 мес. Для этого каждую следующую постановку необходимо проводить:

- на одном приборе амплификации с применением одной версии программного обеспечения прибора;
- используя одну серию комплекта для экстракции и один объем экстракции;
- используя одну серию ПЦР-комплекта.

При этом значения Ct ВКО_{мед.}, m , b не меняются и используются для оценки каждой последующей постановки и расчета концентрации исследуемых и контрольных образцов по величине Ct для двух каналов детекции.

6. На основании проведенной калибровки происходит расчет концентрации РНК (в lg копий в мл) в исследуемых образцах и положительных контролях по каждому из каналов для флуорофоров JOE и ROX ($C_{JOE/ROX}$), независимо, по формуле:

$$C_{JOE/ROX} = (b_{JOE/ROX} - Ct_{\text{истинное JOE/ROX}}) / |m|_{JOE/ROX}, \text{ где}$$

$|m|_{JOE/ROX}$ — модуль¹⁴ значения тангенса угла наклона калибровочной прямой по каналу для флуорофора JOE или ROX,

$b_{JOE/ROX}$ — смещение калибровочной прямой по каналу для флуорофора JOE или ROX,

$Ct_{\text{истинное JOE/ROX}}$ — «истинное» значение Ct по каналу для флуорофоров JOE или ROX, вычисленное с учетом поправки.

ВНИМАНИЕ! Для контрольных образцов выводится два результата подсчета концентрации РНК ВИЧ-1 в lg копий/мл (по каналам для флуорофоров JOE и ROX, независимо). Результаты достоверности контрольных образцов оцениваются согласно таблице 13 и вкладке к набору реагентов.

7. Для исследуемых образцов проводится расчет итоговой концентрации РНК ВИЧ-1 в lg копий/мл на основании полученных значений концентраций по каналам для флуорофоров JOE и ROX следующим образом:

¹⁴ При использовании для расчетов MicroSoft® Excel для этого может использоваться значение функции «абсолютная величина» (ABS).

Вычисляется модуль разницы значений концентрации по каналам для флуорофоров JOE и ROX ($|\Delta C_{JOE/ROX}|$).

1. Если $|\Delta C_{JOE/ROX}| \leq 0,45 \lg$, то конечное значение концентрации рассчитывается как среднее значение концентрации по двум каналам по формуле:

$$(C_{JOE} + C_{ROX}) / 2, \text{ где}$$

$C_{JOE/ROX}$ – значение концентрации, полученное по каналу для флуорофора JOE или ROX.

2. Если $0,45 < |\Delta C_{JOE/ROX}| \leq 0,6 \lg$, то конечное значение концентрации рассчитывается по формуле:

$$(C_{JOE} + C_{ROX} + 0,15) / 2$$

3. Если $|\Delta C_{JOE/ROX}| > 0,6 \lg$, то в качестве конечного значения концентрации указывается большее значение из полученных по обоим каналам.

4. Если по одному из каналов для флуорофоров JOE и ROX отсутствует сигнал, то расчет концентрации ведется по второму каналу.

В результате происходит расчет концентрации исследуемых и контрольных образцов в $\lg$ копий в мл, которая может быть пересчитана в копии в мл или же в Международные Единицы измерения в мл (МЕ/мл), учитывая соотношение $1 \text{ МЕ ВИЧ-1} = 0,58 \text{ копий}$.

ВНИМАНИЕ! При использовании комплекта для экстракции «РИБО-преп», работа с которым включает в себя обязательную процедуру ультрацентрифугирования исследуемых образцов (см. Приложение А), полученный результат концентрации РНК ВИЧ-1 для исследуемых образцов будет превышать истинное значение в 10 раз, что необходимо учитывать при интерпретации результатов.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены результаты для контрольных образцов и калибраторов в соответствии с табл. 13:

Таблица 13

Результаты для контрольных образцов и калибраторов

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
ОК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	определено значение C_t в пределах ± 3 от значения C_t ВКО _{мед}	значение C_t отсутствует	
ПК1	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР		Значение концентрации укладывается в диапазон $\pm 0,5 \lg$ от значения, указанного во вкладыше	
ПК2	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР		Значение концентрации укладывается в диапазон $\pm 0,5 \lg$ от значения, указанного во вкладыше	
K1	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР		определено значение C_t , эффективность амплификации E укладывается в диапазон 0,80-1,20, коэффициент корреляции R^2 не менее 0,95	
K2	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР			
K- ¹⁵	ОТ-ПЦР	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	

Таблица 14

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Заключение	Расшифровка
не обнаружено	Значение C_t по обоим каналам спецификации для РНК ВИЧ-1 отсутствует. Концентрация РНК возбудителя в образце ниже предела обнаружения. Результат интерпретируется, как РНК ВИЧ-1 не обнаружено
«менее 40 копий/мл»	РНК ВИЧ-1 выявлена, однако рассчитанная концентрация меньше диапазона измерения набора реагента. Результат интерпретируется как < 40 копий/мл
«X XXX XXX копий /мл»	Рассчитанное значение концентрации РНК ВИЧ-1 (копий/мл), находится в пределах диапазона измерения набора реагентов. Результат интерпретируется как X XXX XXX копий /мл .
более 10 000 000 копий/мл	РНК ВИЧ-1 выявлена в концентрации выше диапазона измерения набора реагента ¹⁶ . Результат интерпретируется как > 10 000 000 копий/мл
невалидный	Значение C_t по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено, но отличается более чем на 3 от C_t ВКО _{мед} . Требуется повторное ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции РНК.

¹⁵ В случае постановки отрицательного контроля ОТ-ПЦР (K-).

¹⁶ Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести исследуемый образец в Растворителе (например, в 100 раз) и повторить тестирование. Полученный при повторном тестировании результат необходимо умножить на коэффициент разведения образца (в данном примере – на 100).

ВНИМАНИЕ! При использовании комплекта для экстракции «РИБО-преп», работа с которым включает в себя обязательную процедуру ультрацентрифугирования исследуемых образцов, необходимо рассчитанное значение концентрации РНК ВИЧ-1 (копий/мл) разделить на 10.

Возможные ошибки:

1. Для одного или нескольких повторов калибраторов (K1, K2) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX отсутствует, вследствие чего происходит исключение из расчетов данных повторов, и количество повторов каждого калибратора (K1, K2), демонстрирующих достоверные результаты, становится менее 3. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения **калибраторов** в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК, включая **контрольные образцы и калибраторы**.
2. Коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее **0,95** и/или эффективность амплификации E менее **0,8** или более **1,20**. Необходимо проверить правильность заданных концентраций **калибраторов** и правильность выбранного уровня пороговой линии в программном обеспечении прибора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК, включая **контрольные образцы и калибраторы**.
3. Рассчитанное значение C_t ВКО_{мед} при калибровке превышает граничное значение, указанное во вкладыше. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения **контрольных образцов и калибраторов** в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для **всех образцов**, начиная с этапа экстракции РНК, включая **контрольные образцы и калибраторы**.
4. Для положительного контроля экстракции (ПК1 или ПК2) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX отсутствуют или рассчитанные концентрации не укладываются в диапазон $\pm 0,5 \lg$ от значения, указанного во вкладыше. Необходимо проверить правильность установки

- пробирок или обозначения **контрольных образцов** в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для **всех образцов**, начиная с этапа экстракции РНК, включая **контрольные образцы**.
5. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам флуорофоров JOE и/или ROX определено значение порогового цикла C_t . Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения **контрольного образца** в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для **всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК**, начиная с этапа экстракции РНК.
 6. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла (C_t), отличающееся от C_t ВКО_{мед} более, чем на 3 цикла. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения **контрольных образцов** в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для **всех образцов**, начиная с этапа экстракции РНК, включая **контрольные образцы**.
 7. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналам флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX определено значение порогового цикла C_t . Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов на этапе ОТ-ПЦР. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения **контрольного образца** в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ОТ-ПЦР и детекцию для **всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК**.
 8. Для исследуемого образца по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла (C_t) не определено, или отличается от C_t ВКО_{мед} более чем на 3 цикла. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения **образца** в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование

- для **данного образца**, начиная с этапа экстракции РНК.
9. Для исследуемого образца по каналам флуорофоров JOE и ROX не определены значения порогового цикла (C_t), значение C_t по каналу для флуорофора FAM отклоняется от C_t ВКО_{мед} более чем на 2 цикла. Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения **образца** в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для **данного образца**, начиная с этапа экстракции РНК.
10. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую горизонтальную линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии в программном обеспечении прибора. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), необходимо повторить ПЦР-исследование для данного образца, начиная с этапа экстракции РНК.

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 в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Допускается хранение комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA без разуккомплектации при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев от даты изготовления.

Хранение.

Форма 1. ПЦР-комплект» вариант FRT-LA хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL ВИЧ-Duo и ПЦР-буфера-В. ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo и ПЦР-буфер-В хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo хранить в защищенном от света месте. Лиофилизированные реагенты (Смесь ОТ-ПЦР-ферментов, ВКОЛ, калибраторы K1L ВИЧ-Duo и K2L ВИЧ-Duo, контрольные образцы ПКО1L ВИЧ-Duo и ПКО2L ВИЧ-Duo) хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем. Восстановленные реагенты ВКОЛ, K1L ВИЧ-Duo, K2L ВИЧ-Duo, ПКО1L ВИЧ-Duo, ПКО2L ВИЧ-Duo хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев. Восстановленный реагент Смесь ОТ-ПЦР-ферментов хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С не более 3 месяцев.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь ВИЧ-Duo-Luo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте. Лиофилизированные реагенты (ВКОЛ, калибраторы K1L ВИЧ-Duo и K2L ВИЧ-Duo, контрольные образцы ПКО1L ВИЧ-Duo и ПКО2L ВИЧ-Duo) хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем. Восстановленные реагенты ВКОЛ, K1L ВИЧ-Duo, K2L ВИЧ-Duo,

ПКО1L ВИЧ-Duo, ПКО2L ВИЧ-Duo хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев.

Форма 3. Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 хранить при температуре от 2 до 25 °С. ПЦР-комплект» вариант FRT-LA хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL ВИЧ-Duo и ПЦР-буфера-В. ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo и ПЦР-буфер-В хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo хранить в защищенном от света месте. Лиофилизированные реагенты (Смесь ОТ-ПЦР-ферментов, ВКОЛ, калибраторы K1L ВИЧ-Duo и K2L ВИЧ-Duo, контрольные образцы ПКО1L ВИЧ-Duo и ПКО2L ВИЧ-Duo) хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем. Восстановленные реагенты ВКОЛ, K1L ВИЧ-Duo, K2L ВИЧ-Duo, ПКО1L ВИЧ-Duo, ПКО2L ВИЧ-Duo хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев. Восстановленный реагент Смесь ОТ-ПЦР-ферментов хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С не более 3 месяцев.

Форма 4. Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 хранить при температуре от 2 до 25 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь ВИЧ-Duo-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте. Лиофилизированные реагенты (ВКОЛ, калибраторы K1L ВИЧ-Duo и K2L ВИЧ-Duo, контрольные образцы ПКО1L ВИЧ-Duo и ПКО2L ВИЧ-Duo) хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем. Восстановленные реагенты ВКОЛ, K1L ВИЧ-Duo, K2L ВИЧ-Duo, ПКО1L ВИЧ-Duo, ПКО2L ВИЧ-Duo хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев.

Форма 5. Комплект реагентов «РИБО-преп» хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL ВИЧ-Duo и ПЦР-буфера-В. ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo и ПЦР-буфер-В хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo хранить в защищенном от света месте. Лиофилизированные реагенты (Смесь ОТ-ПЦР-ферментов, ВКОЛ, калибраторы K1L ВИЧ-Duo и K2L ВИЧ-Duo, контрольные образцы ПКО1L ВИЧ-Duo и ПКО2L ВИЧ-Duo) хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем. Восстановленные реагенты ВКОЛ, K1L ВИЧ-Duo, K2L ВИЧ-Duo, ПКО1L ВИЧ-Duo, ПКО2L ВИЧ-Duo хранить в холодильной камере при температуре

от 2 до 8 °С не более 3 месяцев. Восстановленный реагент Смесь ОТ-ПЦР-ферментов хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С не более 3 месяцев.

Форма 6. Комплект реагентов «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь ВИЧ-Duo-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте. Лиофилизированные реагенты (BKOL, калибраторы K1L ВИЧ-Duo и K2L ВИЧ-Duo, контрольные образцы ПК01L ВИЧ-Duo и ПК02L ВИЧ-Duo) хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем. Восстановленные реагенты BKOL, K1L ВИЧ-Duo, K2L ВИЧ-Duo, ПК01L ВИЧ-Duo, ПК02L ВИЧ-Duo хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

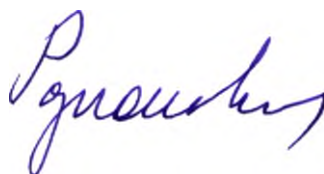
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru ¹⁷

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

¹⁷ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого
достаточно для
проведения п-
количества тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие для
диагностики in vitro



Обратитесь к
инструкции по
применению



Дата изменения



Не допускать
воздействия
солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель



Беречь от влаги

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»

Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК

Непосредственно перед экстракцией необходимо провести ультрацентрифугирование 1 мл плазмы крови (**только** для исследуемых образцов) в течение 1 ч при скорости центрифугирования не менее 24 тыс g, при температуре от 2 до 8 °С. После остановки центрифуги **немедленно** удалить 900 мкл надосадочной жидкости и как можно скорее провести экстракцию из оставшихся 100 мкл исследуемого материала, содержащего осадок, как описано ниже. Ультрацентрифугирование проводить в пробирках с закрывающимися или завинчивающимися крышками на 1,5 мл. Для контролей и калибраторов ультрацентрифугирование не проводят.

Подготовка к проведению процедуры экстракции РНК

1. Включить термостат и установить температуру 65 °С.
2. Прогреть **раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) при температуре до 65 °С до полного растворения кристаллов.

Процедура экстракции РНК

ВНИМАНИЕ! Раствор для лизиса из данного комплекта реагентов имеет резкий запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

1. В каждую пробирку с осадком и 100 мкл надосадочной жидкости, полученными после подготовки исследуемого материала, внести по **300 мкл раствора для лизиса** и по **10 мкл** восстановленного реагента **ВКОЛ**, используя для каждой пробирки и реагента отдельный наконечник с фильтром. Промаркировать пробирки.

*При большом объеме образцов для облегчения процедуры экстракции допускается смешивание в отдельном одноразовом флаконе **раствора для лизиса и ВКО** (из расчета на один образец 300 мкл раствора для лизиса и 10 мкл восстановленного реагента **ВКОЛ**) с последующим внесением по **300 мкл смеси** в пробирки с исследуемыми образцами.*

2. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести по **100 мкл Растворителя**, **10 мкл** восстановленного реагента **ВКОЛ** и **300 мкл раствора для лизиса**.

3. В пробирку положительного контроля экстракции ПК1 внести по 10 мкл восстановленного реагента **BKOL**, 300 мкл раствора для лизиса и 100 мкл восстановленного реагента **PKO1L ВИЧ-Duo**.
4. В пробирку положительного контроля экстракции ПК2 внести по 10 мкл восстановленного реагента **BKOL**, 300 мкл раствора для лизиса и 100 мкл восстановленного реагента **PKO2L ВИЧ-Duo**.
5. При проведении калибровки дополнительно:
В три или четыре пробирки для калибратора К1 внести по 10 мкл восстановленного реагента **BKOL**, 300 мкл раствора для лизиса и 100 мкл восстановленного реагента **K1L ВИЧ-Duo**.
В три или четыре пробирки для калибратора К2 внести по 10 мкл восстановленного реагента **BKOL**, 300 мкл раствора для лизиса и 100 мкл восстановленного реагента **K2L ВИЧ-Duo**.

ВНИМАНИЕ! Порядок использования контрольных образцов и калибраторов описан в разделе «Экстракция РНК из исследуемых образцов».

6. Закрывать крышки и перемешать на вортексе. Осадить капли жидкости на центрифуге.
7. Содержимое пробирок прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате, перемешать и осадить капли жидкости на вортексе.
8. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, плотно закрыть крышки, тщательно перемешать на вортексе (не менее 10 секунд для каждой пробирки).
9. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 12 тыс g** (например, 13400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf).
10. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
11. 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.
12. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1-2 мин при 12 тыс g** на микроцентрифуге.

13. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.

14. Аналогично провести одну отмывку **200 мкл раствора для отмывки 4**.

15. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка.

16. Добавить в пробирки **РНК-буфера**:

- **50 мкл (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-LA, формы 1 и 5)**
- **70 мкл (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L, формы 2 и 6)**

17. Закрыть пробирки и перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически перемешивая на вортексе.

18. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1 мин** при **12 тыс g**. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК.

РНК-пробы готовы к постановке реакции ОТ-ПЦР, которую рекомендуется проводить сразу же после получения очищенной РНК.

РНК-пробы не рекомендуется хранить дольше 30 мин при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение препарата при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 мес, при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

ВНИМАНИЕ! Поскольку экстракция с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» включает в себя обязательную процедуру ультрацентрифугирования исследуемых образцов плазмы крови, полученный результат концентрации РНК ВИЧ-1 для исследуемых образцов будет превышать истинное значение в 10 раз, что необходимо учитывать при интерпретации результатов.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Б1. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»

ВНИМАНИЕ! Лизирующий раствор МАГНО-сорб имеет резкий запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых полипропиленовых пробирок объемом 5 мл и одноразовых крышек (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Промаркировать.
3. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл восстановленный реагент ВКОЛ, компонент А и магнетизированную силику из расчета на одну точку: **10 мкл восстановленного реагента ВКОЛ, 20 мкл компонента А и 30 мкл магнетизированной силики**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции РНК	Восстановленный реагент ВКОЛ, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	140	210
12	130	260	390
18	190	380	570

4. Внести в пробирки на 5 мл по **60 мкл** подготовленной смеси **восстановленного реагента ВКОЛ, компонента А и магнетизированной силики**;
5. Внести в пробирки на 5 мл по **2,6 мл** лизирующего раствора **МАГНО-сорб**.
6. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **1000 мкл** исследуемого образца плазмы, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром. Перемешать пипетированием и закрыть крышкой.
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **1000 мкл Растворителя**.
8. В пробирку положительного контроля экстракции ПК1 внести **1000 мкл** восстановленного реагента **ПКО1L ВИЧ-Duo**.
9. В пробирку положительного контроля экстракции ПК2 внести **1000 мкл** восстановленного реагента **ПКО2L ВИЧ-Duo**.
10. При **проведении калибровки** дополнительно:
В три или четыре пробирки для калибратора К1 внести **1000 мкл** восстановленного реагента **К1L ВИЧ-Duo**.

В три или четыре пробирки для калибратора K2 внести **1000 мкл** восстановленного реагента **K2L ВИЧ-Duo**.

ВНИМАНИЕ! Порядок использования контрольных образцов и калибраторов описан в разделе «Экстракция РНК из исследуемых образцов».

- 11.Перемешать пипетированием, закрыть крышки.
- 12.Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С на 10 мин.**
- 13.Перенести пробирки в магнитный штатив на **6 мин.**
- 14.По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 1000 мкл для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
- 15.Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**, пробирки закрыть крышкой.
- 16.Отобрать необходимое количество одноразовых полипропиленовых пробирок объемом на 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции), промаркировать их.
- 17.Смыть магнетизированную силику со стенок осторожным перемешиванием на вортексе, а затем пипетированием. Перенести всю жидкость в приготовленные пробирки на 1,5 мл.
- 18.Переставить пробирки с открытыми крышками в магнитный штатив на **2 мин.**
- 19.По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
- 20.Добавить в пробирки **700 мкл раствора для отмывки 5**, плотно закрыть крышки, ресуспендировать магнетизированную силику перемешиванием на вортексе. Осадить капли на вортексе и повторить п. 18-19.
- 21.Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6**.
- 22.Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 7**, плотно закрыть крышки, ресуспендировать магнетизированную силику перемешиванием на вортексе. Осадить капли на вортексе.
- 23.Переставить пробирки с открытыми крышками в магнитный штатив на **1 мин**, затем осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.

24. Высушить магнетизированную силику, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин.**
25. Добавить в пробирки **буфер для элюции:**
- **50 мкл (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-LA, формы 1 и 3)**
 - **70 мкл (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L, формы 2 и 4)**
26. Перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат при температуре **60 °С на 5 мин**, через 2 мин перемешать на вортексе.
27. Осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив на **2 мин.** Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных РНК для проведения реакции ОТ-ПЦР осуществляется, не снимая пробирок с магнитного штатива.

РНК-пробы не рекомендуется хранить дольше 30 мин при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку, допускается хранение при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 мес, при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.

Б2. Экстракция нуклеиновых кислот с помощью автоматических станций с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб».

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа». Экстракция нуклеиновых кислот проводится в соответствии с инструкцией по эксплуатации автоматических станций и с использованием соответствующего протокола экстракции.

Объем исследуемых образцов и контрольных образцов экстракции и калибраторов, загружаемых на борт автоматической станции, должен быть увеличен (с учетом запаса) до 1200 мкл.

ВНИМАНИЕ! Порядок использования контрольных образцов и калибраторов описан в разделе «Экстракция РНК из исследуемых образцов».

Объем ВКО – 10 мкл на один образец. При использовании автоматических станций для экстракции НК «открытого типа» (например, Neon 100 (Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария)¹⁸ и форм 3 и 4 рекомендуемый объем элюции – 100 мкл.

¹⁸ Станции, совместимые с наборами реагентов различных производителей.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Экстракция РНК с использованием автоматической станции QIAasymphony SP/AS или QIAasymphony SP (QIAGEN GmbH, Германия)

Экстракция РНК проводится из 1000 мкл плазмы крови с использованием комплекта реагентов **QIAasymphony Virus/Bacteria Midi Kit** в соответствии с инструкцией по запуску автоматической станции QIAasymphony SP/AS с использованием соответствующего протокола («Приложение/ACS») для экстракции ДНК/РНК из 1000 мкл плазмы крови.

Объем исследуемых образцов, контрольных образцов экстракции и калибраторов, загружаемых на борт автоматической станции, должен быть увеличен (с учетом запаса) до 1200 мкл.

ВНИМАНИЕ! Порядок использования контрольных образцов и калибраторов описан в разделе «Экстракция РНК из исследуемых образцов».

Объем ВКО на один образец – 10 мкл, объем реагента RNA Carrier¹⁹ – 3 мкл. Рекомендуемый объем элюции – 60 мкл.

ВНИМАНИЕ! При экстракции используются пробирки объемом 2,0 мл рекомендованные в инструкции по запуску автоматической станции QIAasymphony SP/AS (например, Sarstedt, Германия, или аналогичные).

¹⁹ Входит в состав QIAasymphony Virus/Bacteria Midi Kit (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия).

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Схема приготовления реакционных смесей при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-LA

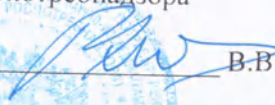
			Объем реагентов на указанное количество исследуемых точек с запасом		
Объем реагента на одну реакцию (мкл)			15.00	10.00	2.00
Количество исследуемых образцов	Количество экстрагируемых образцов ²⁰	Количество реакций ²¹	ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo	ПЦР-буфер-В	Восстановленная Смесь ОТ-ПЦР-ферментов
в случае проведения калибровки набора (по 3 повтора калибраторов K1 и K2)					
1	10	11	165	110	22
2	11	12	180	120	24
3	12	13	195	130	26
4	13	14	210	140	28
5	14	15	225	150	30
6	15	16	240	160	32
7	16	17	255	170	34
8	17	18	270	180	36
9	18	19	285	190	38
10	19	20	300	200	40
11	20	21	315	210	42
12-15	21-24	22-24	Объединить содержимое пробирок		
в случае, когда калибровка набора не проводится					
7	10	11	165	110	22
8	11	12	180	120	24
9	12	13	195	130	26
10	13	14	210	140	28
11	14	15	225	150	30
12	15	16	240	160	32
13	16	17	255	170	34
14	17	18	270	180	36
15	18	19	285	190	38
16	19	20	300	200	40
17	20	21	315	210	42
18-21	21-24	22-24	Объединить содержимое пробирок		

²⁰ Количество экстрагируемых образцов = количество исследуемых образцов + контроли (ОК, ПК1, ПК2) + калибраторы в случае проведения калибровки

²¹ Количество реакций = количество исследуемых образцов + контроли (ОК, ПК1, ПК2) + калибраторы в случае проведения калибровки (по 3 повтора) + запас на один образец.

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 50 лист _____

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

 В.В. Малеев





Инструкция по применению набора
реагентов расположена на сайте
www.amplisens.ru

Краткое руководство

набор реагентов для диагностики in vitro **АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL**

Форма 1: REF Н-3441-1-14;
Форма 2: REF Н-3442-1-14;
Форма 3: REF НКЗ-3443-1-14;
Форма 4: REF НКЗ-3444-1-14;
Форма 5: REF НК1-3445-1-14;
Форма 6: REF НК1-3446-1-14;

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA
Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L
Форма 3: «МАГНО-сорб» вариант 100-1000;
«ПЦР-комплект» вариант FRT-LA
Форма 4: «МАГНО-сорб» вариант 100-1000;
«ПЦР-комплект» вариант FRT-L
Форма 5: «РИБО-преп» вариант 100;
«ПЦР-комплект» вариант FRT-LA
Форма 6: «РИБО-преп» вариант 100;
«ПЦР-комплект» вариант FRT-L



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123, город
Москва, улица Новогиреевская, дом 3А



ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ПОДГОТОВКА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Контроли: восстановленный внутренний контрольный образец (VKOL) – добавляется в каждый образец. Для каждой индивидуальной постановки – 1 отрицательный (OK) и 2 положительных (ПК1 и ПК2) контроля.

Калибровка: При первом использовании набора реагентов необходим анализ дополнительных образцов – калибраторов: K1 и K2, минимум, в трёх повторах каждый (рекомендуется по 4 повтора).

ВНИМАНИЕ! Калибровку необходимо проводить при изменении условий постановки или через каждые 6 месяцев использования одной серии набора реагентов в одинаковых условиях. Под условиями постановки подразумеваются: серия комплекта для экстракции, объем экстракции, прибор для амплификации, версия программного обеспечения прибора.

Подготовка лиофилизированных контролей и калибраторов:

Название контроля	Добавить реагент Растворитель, мкл
ПКО1L ВИЧ-Duo	1200
ПКО2L ВИЧ-Duo	1200
K1L ВИЧ-Duo	1200
K2L ВИЧ-Duo	1200
BKOL	300

Плотно закрыть пробирки и оставить их на 2 мин при температуре от 18 до 25 °С, периодически перемешивая на вортексе. После полного растворения осадить содержимое пробирок на вортексе в течение 3-5 с для сброса капель с крышки.

ЭКСТРАКЦИЯ С ПОМОЩЬЮ «МАГНО-сорб» вариант 100-1000

В отдельной стерильной пробирке подготовить смесь:

Компонент	Объем, мкл	Обозначения
КОЛ (восстановленный)	10х(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей экстракции и калибраторов (в случае проведения калибровки); 1 – запас
Компонент А	20х(N+K+1)	
Магнетизированная силика	30х(N+K+1)	

Действия в пробирках:

Образец/реагент	Объем	Действие
Смесь: ВКОЛ, компонент А, магнетизированная силика	60 мкл	добавить в каждую пробирку
Буферизирующий раствор МАГНО-сорб	2,6 мл	добавить в каждую пробирку
Исследуемые образцы	1000 мкл	добавить в каждую пробирку для исследуемого образца
Растворитель	1000 мкл	добавить в пробирку для ОК
КО1L ВИЧ-Duo	1000 мкл	добавить в пробирку для ПК1
КО2L ВИЧ-Duo	1000 мкл	добавить в пробирку для ПК2

При проведении калибровки дополнительно:

КО1L ВИЧ-Duo	1000 мкл	добавить в 3 или 4 пробирки для калибратора K1
КО2L ВИЧ-Duo	1000 мкл	добавить в 3 или 4 пробирки для калибратора K2

В пробирки с исследуемыми и контрольными образцами:

		- перемешать пипетированием, закрыть крышки, - поместить в термостат на 10 мин при 60 °С, - перенести в магнитный штатив на 6 мин, - осторожно отобрать надосадочную жидкость, - перенести пробирки в обычный штатив
Буфер для отмывки 5	700 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, смыть магнетизированную силику осторожным перемешиванием на вортексе, а затем пипетированием, - перенести всю жидкость в пробирки на 1,5 мл, - переставить пробирки с открытыми крышками в магнитный штатив на 2 мин, - осторожно отобрать надосадочную жидкость, - перенести пробирки в обычный штатив
Буфер для отмывки 5	700 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе, осадить капли, - переставить пробирки с открытыми крышками в магнитный штатив на 2 мин, - осторожно отобрать надосадочную жидкость, - перенести пробирки в обычный штатив
Буфер для отмывки 6	700 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе, осадить капли, - переставить пробирки с открытыми крышками в магнитный штатив на 2 мин, - осторожно отобрать надосадочную жидкость, - перенести пробирки в обычный штатив
Буфер для отмывки 7	200 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе, осадить капли, - переставить пробирки с открытыми крышками в магнитный штатив на 1 мин, - осторожно отобрать надосадочную жидкость, - высушить с открытыми крышками в магнитном штативе в течение 10 мин
Буфер для элюции	50 мкл или	добавить в каждую пробирку (для форм 1 и 3)
	70 мкл	добавить в каждую пробирку (для форм 2 и 4)
		- перемешать на вортексе, - поместить пробирки в термостат на 5 мин при 60 °С, через 2 мин перемешать на вортексе, осадить капли, - переставить в магнитный штатив на 2 мин

Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных РНК для проведения реакции ОТ-ПЦР осуществляется, не снимая пробирок с магнитного штатива. Рекомендуется проведение ОТ-ПЦР сразу после экстракции РНК.

ЭКСТРАКЦИЯ С ПОМОЩЬЮ АВТОМАТИЧЕСКИХ СТАНЦИЙ

Возможно проведение экстракции РНК ВИЧ-1 с помощью автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа» (станции, совместимые с наборами реагентов различных производителей) (например, QIA Neon 100 series, Tecan Schweiz AG («Тикан Швейц АГ»), Швейцария), а также с помощью автоматических станций QIAAsymphony SP/AS или QIAAsymphony SP (QIAGEN GmbH, Германия). Экстракция нуклеиновых кислот проводится в соответствии с инструкцией по эксплуатации соответствующей автоматической станции, с использованием соответствующего протокола экстракции и с соблюдением следующих условий:

Условие	Станции «открытого типа»	QIAAsymphony SP/AS (QIAAsymphony SP)
Объем для экстракции	«МАГНО-сорб» вариант 100-1000	QIAAsymphony Virus/Bacteria Midi Kit
Объем исследуемых и контрольных образцов	должен быть увеличен до 1200 мкл (с учетом запаса)	
Объем ВКО	по 10 мкл на один образец	
Объем RNA Carrier	–	3 мкл
Объем элюции	100 мкл	60 мкл

ЭКСТРАКЦИЯ С ПОМОЩЬЮ «РИБО-преп» вариант 100

ВНИМАНИЕ! Непосредственно перед экстракцией необходимо провести ультрацентрифугирование 1 мл плазмы крови (только для исследуемых образцов) в течение 1 ч при скорости центрифугирования не менее 24 тыс g, при температуре от 2 до 8 °С. После остановки центрифуги **немедленно** удалить 900 мкл надосадочной жидкости и провести экстракцию из оставшихся 100 мкл исследуемого материала, содержащего осадок.

Образец/реагент	Объем	Действие
Исследуемые образцы после ультрацентрифугирования	Осадок и 100 мкл надосадочной жидкости + 300 мкл + 10 мкл	добавить в пробирки для экстракции исследуемых образцов
Раствор для лизиса + ВКО	10 мкл + 300 мкл + 100 мкл	добавить в пробирку для ОК
OL + Раствор для лизиса + O1L ВИЧ-Duo	10 мкл + 300 мкл + 100 мкл	добавить в пробирку для ПК1
OL + Раствор для лизиса + O2L ВИЧ-Duo	10 мкл + 300 мкл + 100 мкл	добавить в пробирку для ПК2

и проведении калибровки дополнительно:

OL + Раствор для лизиса + O1L ВИЧ-Duo	10 мкл + 300 мкл + 100 мкл	добавить в 3 или 4 пробирки для калибратора К1
OL + Раствор для лизиса + O2L ВИЧ-Duo	10 мкл + 300 мкл + 100 мкл	добавить в 3 или 4 пробирки для калибратора К2

в пробирки с исследуемыми и контрольными образцами:

		- закрыть крышками, перемешать на вортексе, осадить капли, - прогреть 5 мин при 65 °С
Раствор для преципитации	400 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, перемешать на вортексе, - центрифугировать 5 мин при 12 тыс g, - удалить надосадочную жидкость
Раствор для отмывки 3	500 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, промыть осадок переворачиванием, - центрифугировать 1-2 мин при 12 тыс g, - удалить надосадочную жидкость
Раствор для отмывки 4	200 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, промыть осадок переворачиванием, - центрифугировать 1-2 мин при 12 тыс g, - удалить надосадочную жидкость, - открыть пробирки, подсушить осадок 5 мин при 65 °С
РНК-буфер	50 мкл или	добавить в каждую пробирку (для форм 1 и 5)
	70 мкл	добавить в каждую пробирку (для форм 2 и 6)
		- закрыть крышки, перемешать на вортексе, - поместить в термостат на 5 мин при 65 °С, периодически помешивая, - центрифугировать 1 мин при 12 тыс g

надосадочная жидкость содержит очищенную РНК

ВНИМАНИЕ! Рекомендуется проведение ОТ-ПЦР сразу после экстракции РНК.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA

Общий объем реакционной смеси: 50 мкл, включая объем пробы РНК, 25 мкл.
В пробирку со **Смесью ОТ-ПЦР-ферментов** добавить **60 мкл Восстановителя ферментов**.
В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo	15x(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей и калибраторов (в случае проведения калибровки); 1 – запас
ПЦР-буфер-В	10x(N+K+1)	
Смесь ОТ-ПЦР ферментов восстановленная	2x(N+K+1)	

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

Отобрать необходимое количество пробирок для ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 25 мкл	
Подготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 25 мкл проб РНК, экстрагированных из:	
Исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов
ОК, ПК1, ПК2	в пробирки для ОК, ПК1 и ПК2 , соответственно
ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo (в случае калибровки)	в 3 или 4 пробирки для K1
ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo (в случае калибровки)	в 3 или 4 пробирки для K2

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Общий объем реакционной смеси: 50 мкл, включая объем пробы РНК 50 мкл.
Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью ВИЧ-Duo-Lyo** для проведения ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных образцов, калибраторов (в случае калибровки).

Внести по 50 мкл проб РНК, экстрагированных из:	
Исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов
ОК, ПК1, ПК2	в пробирки для ОК, ПК1 и ПК2 , соответственно
ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo (в случае калибровки)	в 3 или 4 пробирки для K1
ПЦР-смесь-FL ВИЧ-Duo (в случае калибровки)	в 3 или 4 пробирки для K2

ВНИМАНИЕ! При использовании амплификаторов планшетного типа после добавления пробы РНК содержимое пробирки необходимо тщательно перемешать пипетированием и осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ОТ-ПЦР (–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести реагент, в котором проводится элюция РНК (либо лиофилизированную воду) в объеме 25 мкл (для форм 1, 3 и 5) и 50 мкл (для форм 2, 4 и 6).

ВНИМАНИЕ! При экстракции с помощью метода магнитной сепарации избегать попадания сорбента в реакционную смесь!

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени».

Цикл	Программа амплификации для приборов роторного типа				Программа амплификации для приборов планшетного типа			
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1	95	15 мин	–	1
3	95	10 с		5	95	10 с		5
	52	20 с			52	20 с		
	72	30 с			72	30 с		
4	95	10 с		40	95	10 с		40
	55	20 с	FAM, JOE, ROX		55	30 с	FAM, JOE, ROX	
	72	30 с			72	30 с		

настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор.

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 4 лист _____

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

 В.В. Малеев

УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека

В.В. Малеев

«02»

11

2017 г.

СВЕДЕНИЯ О НОРМАТИВНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ

НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

Набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL

1. Наименование медицинского изделия:

Набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL

2. Формы комплектации:

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Форма 3: «МАГНО-сорб» вариант 100-1000; «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA

Форма 4: «МАГНО-сорб» вариант 100-1000; «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Форма 5: «РИБО-преп» вариант 100; «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA

Форма 6: «РИБО-преп» вариант 100; «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Формы 1 и 2 предназначены для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», позволяют провести калибровку набора реагентов и выявлять РНК в количественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные Производителем.

Формы 3, 4, 5 и 6 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из биологического материала, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», позволяют провести калибровку набора реагентов и выявлять РНК в количественном формате.

Форма 1 рассчитана на проведение 110 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

Форма 2 рассчитана на проведение 96 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

Формы 3 и 5 рассчитаны на экстракцию и проведение 110 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

Формы 4 и 6 рассчитаны на экстракцию и проведение 96 реакций обратной

транскрипции и амплификации, включая контроли.

3. Технические условия: ТУ 21.20.23-344-01897593-2017

4. Свидетельства на товарный знак:

АмплиСенс® № 212724, срок действия свидетельства до 06 октября 2020 г.;

AmpliSens® № 321480, срок действия свидетельства до 03 октября 2025 г.

5. Разработчик:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)

6. Производитель:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)

7. Сведения о готовности производителя (изготовителя) к серийному выпуску:

- Сертификат соответствия ГОСТ ISO 13485-2011 (ISO 13485:2003), регистрационный номер № РОСС RU.31508.04ИЕЧ0.ОС.01.085.2016, дата выдачи 18.10.2016 г., срок действия до 18.10.2019 г.

8. Сведения о соответствии национальным стандартам РФ на продукцию:

Набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-Duo-FL отвечает качеству, технической и биологической безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации» (в части соответствия технической документации), ГОСТ ISO

14971-2011 «Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям», ГОСТ ISO 17511-2011 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам», ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro», ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации», ГОСТ 14192-96 «Маркировка грузов», ГОСТ 15.309-98 «Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения» (в части соответствия технической документации), 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», а также соответствует показателям качества, изложенным в ТУ 21.20.23-344-01897593-2017.

Подтверждается следующими документами:

Акт оценки результатов технических испытаний медицинского изделия для диагностики in vitro 99/2017-04 от 10 августа 2017 г. Составлен Испытательным лабораторным центром Федерального государственного бюджетного учреждения здравоохранения Головной центр гигиены и эпидемиологии ФМБА России (ФГБУЗ ГЦГиЭ ФМБА России), г. Москва. Полномочия на проведение испытаний – Аттестат аккредитации испытательного лабораторного центра: № RA.RU.510207. Дата внесения сведений в реестр аккредитованных лиц 09.06.2016. Срок действия – бессрочно.

9. Сведения о порядке классификации изделия по приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н и Приказу Минздрава России от 25.09.2014 г. № 557н:

Вид медицинского изделия в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий – 106370.

10. Класс потенциального риска применения медицинского изделия в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий:

Класс 3 в соответствии с Приказом МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н и п. 5.2.2 ГОСТ Р 51088.

11. Код ОКПД 2 (Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности):

ОКПД 2 21.20.23.110

12. Комплект документов для регистрации:

Комплект документов для государственной регистрации подготовлен в соответствии с Правилами регистрации медицинских изделий (Постановление правительства РФ от 27.12.12 № 1416), пунктами 9 (заявление о регистрации) и 10 (комплект документов).

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 3 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



 В.В.Малеев

КОПИЯ ВЕРНА

В.В. Малеев
Зам. директора
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



**СИСТЕМА ДОБРОВОЛЬНОЙ СЕРТИФИКАЦИИ
«ГЛОБАЛ КОНСАЛТ»
№ РОСС RU.31508.04ИЕЧ0**

**ОРГАН ПО СЕРТИФИКАЦИИ ООО «ГОСТЕСТ»
№ РОСС RU.31508.04ИЕЧ0.ОС.01.2016**

Российская Федерация, 119021, г. Москва, Площадь Зубовская, дом 3, строение 1.
тел.: +7 (495) 781-34-34, e-mail: info@gostest.com, сайт: www.gostest.com

№ 085

СЕРТИФИКАТ СООТВЕТСТВИЯ

Выпуск 1. СМК сертифицирована с «18» октября 2016 года

Выдан: **Федеральному бюджетному учреждению науки
«Центральный научно – исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека
(ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)**

Адрес: Российская Федерация, 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

НАСТОЯЩИЙ СЕРТИФИКАТ УДОСТОВЕРЯЕТ:

система менеджмента качества применительно
к производству и выходному контролю медицинских изделий
для диагностики in vitro

СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ

ГОСТ ISO 13485-2011 (ISO 13485:2003)

Разъяснения, касающиеся области сертификации СМК, могут быть получены путем консультаций с
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Регистрационный номер

№ РОСС RU.31508.04ИЕЧ0.ОС.01.085.2016

Дата регистрации 18.10.2016

Срок действия до 18.10.2019

Руководитель органа по сертификации

А.В. Боброва

Председатель комиссии

Д.П. Баранова



Настоящий сертификат обязывает организацию поддерживать состояние выполняемых работ в соответствии с вышеуказанным(-и) стандартом(-ами), что будет находиться под контролем Органа по сертификации ООО «ГОСТЕСТ» и подтверждаться при прохождении ежегодного инспекционного контроля. Информация о прохождении инспекционного контроля указывается на обратной стороне сертификата.

КОПИЯ
С КОПИИ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

КОПИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

на товарный знак (знак обслуживания)

№ 212724

На основании Закона Российской Федерации "О товарных знаках, знаках обслуживания и наименованиях мест происхождения товаров", введенного в действие 17 октября 1992 года, Российским агентством по патентам и товарным знакам выдано настоящее свидетельство на товарный знак (знак обслуживания)

Владельцем

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии

Министерства Здравоохранения Российской Федерации

111123, Москва, ул. Новотиреевская, д.3а (RU)

В отношении следующих товаров (услуг):

05 - диагностические препараты для медицинских (см. на обороте)

по заявке № 2000725540, дата поступления 06.10.2000

Приоритет от 06.10.2000

Регистрация товарного знака действует на всей территории Российской Федерации в течение 10 лет с 06 октября 2000 г.

Зарегистрировано в Государственном Реестре товарных знаков и знаков обслуживания Российской Федерации

г. Москва 21 мая 2002 г.

Генеральный Директор

А.Д. Коровин

АмплиСенс

Продолжение перечня товаров (услуг)

целей, а именно: тест-системы, основанные на полимеральной цепной реакции для выявления ДНК/РНК различных возбудителей инфекционных болезней; комплекты препаратов, составляющие данные тест-систем; отдельные компоненты вышеперечисленных тест-систем.

82

Город Москва, Российская Федерация.
Восемнадцатого марта две тысячи шестого года, я,
Шашлыкова Марина Олеговна, нотариус г.Москвы,
свидетельствую верность этой копии с подлинником
документа. В последнем подчисток, приписок, зачеркнутых
слов и иных неоговоренных исправлений или каких-либо
особенностей нет.



Шашлыкова М.О.

Город Москва.

Шестнадцатого мая две тысячи двенадцатого года.

Я, Калачев Олег Анатольевич, нотариус города Москвы, свидетельствую верность настоящей копии с копии документа. В представленной копии подчисток, приписок, зачеркнутых слов и иных неоговоренных исправлений или каких-либо особенностей нет.

Зарегистрировано в реестре за № 1к1-3271.

Взыскано по тарифу: 120 руб. 00 коп.

Нотариус

Компьютерная система "Эксперт" МоноТ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПРИЛОЖЕНИЕ

к свидетельству на товарный знак (знак обслуживания)

№ 212724

Изменение наименования, фамилии, имени, отчества
правообладателя и/или места нахождения или места жительства

Правообладатель: *Федеральное государственное учреждение науки
"Центральный научно-исследовательский институт
эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека, 111123, Москва, ул.
Новогиреевская, д. 3а (RU)*

Прежнее наименование/имя правообладателя: *Центральный
научно-исследовательский институт эпидемиологии
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 111123,
Москва, ул.Новогиреевская, д.3а (RU)*



Запись внесена в Государственный реестр
товарных знаков и знаков обслуживания
Российской Федерации 21 февраля 2007 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной
собственности, патентам и товарным знакам

Б.И. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПРИЛОЖЕНИЕ

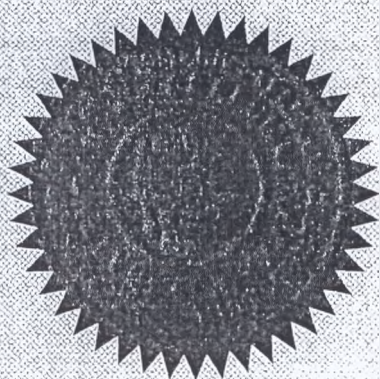
к свидетельству на товарный знак (знак обслуживания)

№ 212724

Продление срока действия регистрации товарного знака

Правообладатель: *Федеральное государственное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а (RU)*

Дата, до которой продлен срок действия регистрации: *06 октября 2020 г.*



Запись внесена в Государственный реестр товарных знаков и знаков обслуживания Российской Федерации *29 апреля 2010 г.*

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПРИЛОЖЕНИЕ

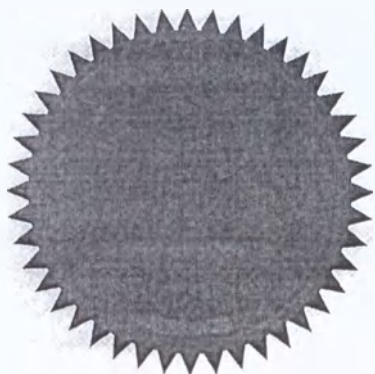
к свидетельству на товарный знак (знак обслуживания)

№ 212724

Изменение наименования, фамилии, имени, отчества
правообладателя и/или места нахождения или места жительства

Правообладатель: *Федеральное бюджетное учреждение науки
"Центральный научно-исследовательский институт
эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека, 111123, Москва,
ул.Новогиреевская, д.3а (RU)*

Прежнее наименование/имя правообладателя: *Федеральное
государственное учреждение науки "Центральный
научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной
службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а
(RU)*



Запись внесена в Государственный реестр
товарных знаков и знаков обслуживания
Российской Федерации 13 ноября 2012 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Б.П. Симонов

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью. 4 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора


В.В.Малеев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

на товарный знак (знак обслуживания)

№ 321480

AmpliSens

Правообладатель: *Федеральное государственное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 111123, Москва, ул.Новогиреевская, 3а (RU)*

Заявка № 2005725086

Приоритет товарного знака 03 октября 2005 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре товарных знаков и знаков обслуживания

Российской Федерации 21 февраля 2007 г.

Срок действия регистрации истекает 03 октября 2015 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПРИЛОЖЕНИЕ

к свидетельству на товарный знак (знак обслуживания) № 321480

Продление срока действия исключительного права на товарный знак

Правообладатель: *Федеральное бюджетное учреждение науки
"Центральный научно-исследовательский институт
эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека, 11123,
Москва, ул.Новогиреевская, 3а (RU)*

Дата, до которой продлен срок действия исключительного права:
03 октября 2025 г.

Запись внесена в Государственный реестр
товарных знаков и знаков обслуживания
Российской Федерации **28 сентября 2015 г.**

Заместитель руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности



Л.Л. Кирий

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 2 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



В.В.Малеев