

«УТВЕРЖДАЮ»

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



В.Г. Акимкин

«14» октября 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для количественного определения РНК вируса
иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT»

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	10
ФОРМАТ FRT	11
СОСТАВ.....	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	13
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	14
ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИИ КДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	15
А. Подготовка пробирок для амплификации.....	15
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».....	17
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	18
СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	22
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	23
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- сорб-12»	24
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- преп»	27
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Экстракция РНК с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (bioMerieux, Франция).....	29
В1. Экстракция РНК из 100 мкл образца, лизис вне прибора	29
В2. Экстракция РНК из 100 мкл или 1000 мкл образца с автоматическим лизисом в приборе.....	30
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО- сорб»	32
Г1. Экстракция из 1000 мкл образца плазмы	32
Г2. Экстракция из 200 мкл образца плазмы	34
Г3. Экстракция нуклеиновых кислот с помощью автоматической станции (например, с помощью роботизированной станции для дозирования жидкостей Xiril (Xiril AG, Швейцария)	36
ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Порядок работы при использовании комплектов для экстракции РНК, не входящих в состав данного набора реагентов (при работе с формой 5)	37
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	39

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT» предназначен для количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Материалом для проведения ПЦР служат пробы РНК, выделенные из плазмы крови.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из плазмы крови совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО), проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (формат FRT). По каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ВКО, который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. По каналу, соответствующему флуорофору JOE, детектируется продукт амплификации кДНК ВИЧ-1. Положительные контрольные образцы этапа экстракции ПКО-1-ВИЧ и ПКО-2-ВИЧ детектируются по каналам, соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE (ВИЧ-1). Контрольные образцы амплификации (ДНК-калибраторы) – KB1 ВИЧ и KB2 ВИЧ, а также калибратор *HIV-Q* (при работе с

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

формой 5), аналогично детектируются по каналам, соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE (ВИЧ-1).

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб-12», «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 4 включает комплекты реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000, «ПЦР-комплект» вариант FRT – 2 штуки.

Форма 5 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT и «Комплект для калибровки HIV-Q».

Форма 6 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Примечание – Форма 3 удалена

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала методом сорбции на силикагеле, реакцию обратной транскрипции РНК и амплификацию кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала методом преципитации, реакцию обратной транскрипции РНК и амплификацию кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 4 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала магнитной сепарацией, реакцию обратной транскрипции РНК и амплификацию кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 5 и 6 предназначены для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо дополнительно использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Линейный диапазон измерения набора реагентов

Вид клинического материала	Объем экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Линейный диапазон измерения РНК ВИЧ-1, копий/мл
Плазма крови	100	«РИБО-сорб-12» «РИБО-преп» NucliSENS easyMAG	ПЦР-комплект вариант FRT	500 – 10.000.000
Плазма крови	200	«МАГНО-сорб»	ПЦР-комплект вариант FRT	250 – 10.000.000
Плазма крови с предварительным ультрацентрифуги- рованием	1000	«РИБО-сорб-12» «РИБО-преп»	ПЦР-комплект вариант FRT	50 – 10.000.000
Плазма крови	1000	«МАГНО-сорб» NucliSENS easyMAG	ПЦР-комплект вариант FRT	50 – 10.000.000

Аналитическая специфичность

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

Перекрестные реакции для указанных организмов и вирусов зарегистрированы не были.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического 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».

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 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 односторонним. 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, упаковку², биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром³. 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

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

³ Для удаления надсадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

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 клинично-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 набор реагентов безопасен.

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:

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 1. Экстракция РНК из клинического материала

1. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК – «РИБО-сорб-12», «РИБО-преп» (ПУ № ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» (ПУ № ФСР 2010/07265) или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 5, 6.
2. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
3. Центрифуга/вортекс.
4. Автоматические дозаторы переменного объема.
5. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл и до 1000 мкл.
6. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
7. Штативы для наконечников и пробирок объемом 1,5 мл.
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб РНК.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Емкость для сброса наконечников.

При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб-12» или «РИБО-преп»:

1. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
2. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс g.
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
4. Одноразовый флакон на 10-20 мл.

При использовании комплекта реагентов «МАГНО-сорб»:

1. Термостат для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм от 25 до 100 °С.
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
3. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл.
4. Магнитный штатив для пробирок на 5 мл, диаметр 12 мм.

5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
6. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
7. Одноразовые полипропиленовые или полистирольные пробирки объемом до 5 мл диаметром 12 мм, круглодонные.
8. Одноразовые полипропиленовые крышки для пробирок объемом до 5 мл диаметром 12 мм.
9. Электронный или механический дозатор переменного объема с возможностью дозирования от 1000 до 5000 мкл.
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл, до 1000 мкл и до 5000 мкл.
11. В случае экстракции нуклеиновых кислот с помощью автоматической станции – роботизированная станция для дозирования жидкостей Xiril (Xiril AG, Швейцария).

При использовании автоматических станций для выделения нуклеиновых кислот:

1. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК (например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция), QIAasympphony SP (QIAGEN, Германия)).
2. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например, NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) (bioMérieux, Франция), QIAasympphony Virus/Bacteria Midi Kit (QIAGEN, Германия)).

ЗОНА 2. Проведение реакции обратной транскрипции, ПЦР и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
2. Центрифуга/вортекс.
3. Автоматические дозаторы переменного объема.
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл в штативах.
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
6. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость для сброса наконечников.
9. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного типа (например, Rotor-Gene 3000/ 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия)) или

планшетного типа (например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» и «ДТ-322» («ДНК-Технология», Россия)) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

10. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл:

- а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой - при использовании прибора планшетного типа;
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Для проведения анализа используется плазма периферической крови. Взятие крови проводится утром натощак в пробирку с 3 % раствором ЭДТА из расчета 1:20. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g. Хранить плазму можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

В отдельных случаях допускается использование сыворотки крови. Аналитическая чувствительность набора реагентов для данного материала сохраняется, однако клиническая чувствительность ввиду соосаждения вирусных частиц при ретракции сгустка может быть существенно снижена. Хранить сыворотку можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

Комплект реагентов «РИБО-сорб-12» – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ⁴	5,8	4 флакона
Раствор для отмывки ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость ⁴	8,0	4 флакона
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	15,0	4 флакона
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона
Сорбент	Суспензия белого цвета	0,4	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 48 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ⁴	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2.

⁴ При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса и раствора для отмывки ВИЧ при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость ⁵	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость ⁵	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 выделение РНК/ДНК из 100 проб объемом 1000 мкл, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 4.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив		Описание	Объем, мл	Кол-во
ДТТ лиофилизированный		Порошок белого цвета	---	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT ВИЧ		Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT		Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	4 пробирки
Полимераза (TaqF)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	4 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMiv)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	4 пробирки
ДНК-калибраторы	КВ1 ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
	КВ2 ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
Буфер для элюции		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

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

ФОРМАТ FRT

Комплект реагентов рассчитан на проведение 80 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 5 и 6 (в количестве 1 шт.) и формы 4 (в количестве 2 шт.).

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная жидкость соломенно-желтого цвета	1,2	4 пробирки
ПКО-1-ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
ПКО-2-ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
ВКО ВИЧ-М-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	4 пробирки

Комплект реагентов «Комплект для калибровки HIV-Q» включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Калибратор HIV-Q	Порошок желтого цвета	---	1 пробирка
Растворитель Q	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	3 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 1 калибровки. Входит в состав формы комплектации 5.

К набору реагентов прилагается на цифровом носителе или находится на официальном сайте Изготовителя программное обеспечение AmpliSens Soft Monitor FRT (в формате Microsoft® Excel) для автоматической обработки результатов.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Проведение реакции обратной транскрипции и амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в соответствии с инструкцией к используемому набору:

- при использовании комплекта реагентов **«РИБО-сорб-12»** порядок работы см. в **приложении А** «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб-12».
- при использовании комплекта реагентов **«РИБО-преп»** порядок работы см. в **приложении Б** «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп».
- при использовании автоматической станций для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (bioMerieux, Франция) порядок работы см. в **приложении В** «Экстракция РНК с использованием автоматической станций для выделения нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG».
- при использовании комплекта реагентов **«МАГНО-сорб»** порядок работы см. в **приложении Г** «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб».
- при использовании комплектов реагентов для выделения, не входящих в состав данного набора реагентов, порядок работы см. в **приложении Д** «Порядок работы при использовании комплектов для экстракции РНК, не входящих в состав данного набора реагентов (при работе с формой 5)».

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

ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИИ КДНК 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.

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов.

1. До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с учетом количества исследуемых, контрольных образцов и калибраторов.
3. **Для приготовления реакционной смеси** необходимо в пробирку с **DTT лиофилизированным** добавить все содержимое пробирки с **ОТ-ПЦР-смесью-2-FEP/FRT**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием. Приготовленная смесь может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 недели. Для приготовления реакционной смеси необходимо в отдельной одноразовой пробирке смешать реагенты из расчета на 1 реакцию: **15 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT ВИЧ**, **10 мкл смеси ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT** и **DTT лиофилизированного**, **1,0 мкл полимеразы (TaqF)** и **0,5 мкл ТМ-Реввертазы (MMIv)**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием. Для 12 (стандартная панель экстракции комплектом реагентов «РИБО-сорб-12») – 16 (экстракция с использованием двух картриджей easyMAG) образцов после экстракции рекомендуется готовить реакционную смесь на 20 реакций, для этого в пробирку с **DTT лиофилизированным** добавить все содержимое пробирки с **ОТ-ПЦР-смесью-2-FEP/FRT**, все содержимое пробирки с **ОТ-ПЦР-смесью-1-FRT ВИЧ**, все содержимое пробирки с **полимеразой (TaqF)** и все содержимое пробирки с **ТМ-Реввертазой (MMIv)**.

Приготовленная смесь не хранится.

4. Внести в пробирки по **25 мкл** готовой реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
5. Используя наконечник с фильтром, в пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. **Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.**
ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, выделенных с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб», «МАГНО-сорб» и «NucliSENS easyMAG», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
6. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль экстракции (ПК-1)** – внести в пробирку **25 мкл пробы РНК**, выделенной из образца ПКО-1-ВИЧ.
 - б) **положительный контроль экстракции (ПК-2)** – внести в пробирку **25 мкл пробы РНК**, выделенной из образца ПКО-2-ВИЧ.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **25 мкл пробы РНК**, выделенной из образца ОКО.
 - г) **положительный контроль ПЦР (К+₁)** – внести в две пробирки по **25 мкл ДНК-калибратора KB1 ВИЧ**,
 - д) **положительный контроль ПЦР (К+₂)** – внести в две пробирки по **25 мкл ДНК-калибратора KB2 ВИЧ**.

Содержимое пробирок с добавленными контрольными образцами необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с готовой реакционной смесью внести **25 мкл буфера для элюции**.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «ВИЧ-Монитор-FRT» (см. табл. 1, 2, 3).

Таблица 1

Программа «ВИЧ-Монитор-FRT» для приборов роторного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	50	30 мин	—	1
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	—	1
Cycling/Циклирование	95	20 с	—	5
	52	30 с	—	
	72	30 с	—	
Cycling 2/Циклирование 2	95	20 с	—	40
	55	30 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	30 с	—	

Таблица 2

Программа «ВИЧ-Монитор-FRT» для приборов планшетного типа (за исключением приборов фирмы «ДНК-Технология»)

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	30 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	20 с	—	5
	52	30 с	—	
	72	30 с	—	
4	95	20 с	—	42
	55	40 с	FAM, HEX	
	72	30 с	—	

Программа «ВИЧ-Монитор-FRT» для приборов фирмы «ДНК-Технология»

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	30 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	20 с	—	5
	52	30 с	—	
	72	30 с	—	
4	95	5 с	—	42
	60	30 с	-	
	55	40 с	FAM, HEX	

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

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации кДНК ВКО,
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК ВИЧ.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов.

На основании значений порогового цикла C_t (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией) и исходя из заданных значений калибраторов KB1 и KB2 происходит автоматическое построение калибровочного графика и расчет значений копий кДНК ПКО (по каналу JOE/HEX) и

ВКО (по каналу FAM) в пробе ПЦР. Полученные значения используют для расчета концентрации РНК ВИЧ в исследуемых и контрольных образцах по формуле:

$$\frac{\text{Число копий кДНК ВИЧ в пробе ПЦР}}{\text{Число копий кДНК ВКО в пробе ПЦР}} \times \text{коэффициент А} \times \text{коэффициент В} = \text{копий РНК ВИЧ/мл плазмы}$$

$$\text{Коэффициент А} = \frac{100}{\text{объем экстракции, мкл}}$$

ВНИМАНИЕ! Для положительных контролей (ПК-1 и ПК-2) расчет концентрации производится без учета коэффициента А.

Коэффициент В (число копий ВКО/мл плазмы) указывается во вкладыше к данной серии набора реагентов и не может быть использован для расчета результатов, полученных при анализе с использованием реагентов других серий. Для **формы 5** коэффициент В вычисляется исходя из калибровки при первой постановке набора данной серии (см. **приложение Д** «Порядок работы при использовании комплектов для экстракции РНК, не входящих в состав данного набора реагентов (при работе с формой 5)»).

ВНИМАНИЕ! Если результат больше, чем 10.000.000 копий/мл, то он выдается как **результат более 10.000.000 копий РНК ВИЧ/мл**. При получении значения выше линейного диапазона, образец может быть повторно протестирован после 10-кратного разведения; полученный результат умножают на 10. Если результат меньше, чем 500 копий/мл при экстракции из 100 мкл образца, 250 копий/мл при экстракции из 200 мкл образца и 50 копий/мл при экстракции из 1 мл образца, то он выдается как **результат менее 500/250/50 копий РНК ВИЧ/мл**, соответственно.

Примечание – В случае необходимости получения результатов измерения в Международных Единицах (МЕ/мл) результаты, измеренные в единицах копий/мл, необходимо умножить на 1,75 (т.е. 1 копия=1,75 МЕ, 1 МЕ=0,57 копий).

ВНИМАНИЕ! Граничные значения концентрации ВКО указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также инструкции к соответствующим приборам для ПЦР в реальном времени и методические рекомендации по применению набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT».

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контрольных образцов в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 4).

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результат амплификации по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow/HEX
ОК	Экстракция РНК, ПЦР	положительный (концентрация ВКО больше граничного)	Значение <i>Ct</i> отсутствует Отрицательный
ПК-1	Экстракция РНК, ПЦР	положительный (концентрация ВКО больше граничного)	положительный Должен уложиться в диапазон во вкладыше по результатам расчетов через ВКО копий/мл
ПК-2	Экстракция РНК, ПЦР	положительный (концентрация ВКО больше граничного)	положительный Должен уложиться в диапазон во вкладыше по результатам расчетов через ВКО копий/мл
K ₊ ₁	ПЦР	положительный	положительный
K ₊ ₂	ПЦР	положительный	положительный
K ₋	ПЦР	Отрицательный Значение <i>Ct</i> отсутствует	Отрицательный Значение <i>Ct</i> отсутствует

Граничные (минимально допустимые) значения концентрации ВКО для контрольных образцов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT» данной серии.

ВНИМАНИЕ!

1. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (ОК) по каналу JOE/Yellow/HEX и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам FAM/Green и JOE/Yellow/HEX получено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК ВИЧ, начиная с этапа экстракции РНК.
2. Если концентрация ВКО в таблице результатов по соответствующему каналу ниже граничного значения, указанного во вкладыше, требуется перестановка данной пробы, начиная с первого этапа анализа.

ФОРМАТ FRT

3. Если коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0.98, требуется перестановка ПЦР для всех проб.
4. Если рассчитанные концентрации ПКО-1-ВИЧ и ПКО-2-ВИЧ не укладываются в диапазон, указанный во вкладыше, требуется перестановка всех проб, начиная с первого этапа анализа (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. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-сорб-12», «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «МАГНО-сорб» хранить при температуре от 2 до 25 °С. «ПЦР-комплект» и «Комплект для калибровки *HIV-Q*» хранить при температуре не выше минус 16 °С. Не допускается замораживание / оттаивание KB1 ВИЧ, KB2 ВИЧ, ПКO-1-ВИЧ, ПКO-2-ВИЧ и ВКО ВИЧ-M-FRT более двух раз, после размораживания KB1 ВИЧ, KB2 ВИЧ, ПКO-1-ВИЧ, ПКO-2-ВИЧ и ВКО ВИЧ-M-FRT хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 мес. ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT ВИЧ хранить в защищенном от света месте.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель 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.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru⁶.

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

Главный врач
ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России



С.А. Богдан

⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб-12»

Для повышения чувствительности рекомендуется провести предварительное ультрацентрифугирование 1 мл плазмы в течение 1 ч при скорости центрифуги не менее 24000 g при температуре от 2 до 8 °С. Затем отобрать 900 мкл надосадочной жидкости и работать с осадком (100 мкл) как описано ниже. Ультрацентрифугирование проводится в пробирках с завинчивающимися крышками на 1,5 мл.

Порядок работы

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки ВИЧ** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Промаркировать пробирки.
3. На дно каждой пробирки внести по **10 мкл ВКО ВИЧ-М-FRT**.
4. В пробирки внести по **450 мкл лизирующего раствора**.

При большом объеме образцов для облегчения процедуры экстракции допускается смешивание в отдельном одноразовом флаконе **лизирующего раствора и ВКО** (из расчета на один образец 450 мкл лизирующего раствора и 10 мкл ВКО) с последующим внесением по **450 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл.

При экстракции РНК из 12 проб, включая контроли, допускается добавление во флакон с **лизирующим раствором 130 мкл ВКО ВИЧ-М-FRT**. После тщательного перемешивания внести по **450 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл. Смесь **лизирующего раствора с ВКО ВИЧ-М-FRT** хранить не более 2 ч.

5. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя наконечники с фильтром. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить на центрифуге для сброса капель жидкости с крышки.
6. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (ПК-1, ПК-2)**. Для этого в приготовленную пробирку ПК-1 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПК-1-ВИЧ**, а в приготовленную пробирку ПК-2 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПК-2-ВИЧ**, перемешать содержимое пробирок на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.

7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
 8. Ресуспендировать сорбент, интенсивно перемешивая на вортексе. Добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **25 мкл ресуспендированного сорбента**.
 9. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 10 мин при комнатной температуре, тщательно перемешивая каждые 2 мин.
 10. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g (например, 10 тыс об/мин для центрифуги *MiniSpin, Eppendorf*) в течение 1 мин.
 11. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
 12. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки ВИЧ**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
 13. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Отобрать раствор для отмывки 3 из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
 14. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**.
 15. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 7**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Полностью отобрать раствор для отмывки 7 из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
 16. Высушить сорбент, поместив пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре 60 °C на 10 мин.
 17. Добавить в каждую пробирку по **50 мкл буфера для элюции** и ресуспендировать сорбент. Прогреть в термостате при температуре 60 °C 5 мин, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 12 тыс g (например, 13 400 об/мин для центрифуги *MiniSpin, Eppendorf*) в течение 1 мин.
- РНК-пробы готовы к постановке реакции ОТ-ПЦР, которую рекомендуется

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

проводить сразу же после получения очищенной РНК.

Примечание – При появлении признаков взмучивания сорбента необходимо вновь осадить сорбент на центрифуге при 12 тыс g в течение 1 мин.

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 и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес или не выше минус 68 °С в течение года.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»

Для повышения чувствительности рекомендуется провести предварительное ультрацентрифугирование 1 мл плазмы в течение 1 ч при скорости центрифуги не менее 24000 g при температуре от 2 до 8 °С. Затем отобрать 900 мкл надосадочной жидкости и работать с осадком (100 мкл) как описано ниже. Ультрацентрифугирование проводится в пробирках с завинчивающимися крышками на 1,5 мл.

Порядок работы

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре до 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Промаркировать пробирки.
3. На дно каждой пробирки внести по **10 мкл ВКО ВИЧ-M-FRT**.
4. В пробирки внести по **300 мкл раствора для лизиса**.

*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 ВКО) с последующим внесением по **300 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл.*

5. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя наконечники с фильтром. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить на центрифуге для сброса капель жидкости с крышки.
6. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (ПК-1, ПК-2)**. Для этого в приготовленную пробирку ПК-1 с раствором для лизиса добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПК-1-ВИЧ**, а в приготовленную пробирку ПК-2 с раствором для лизиса добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПК-2-ВИЧ**, перемешать содержимое пробирок на вортексе.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с раствором для лизиса добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
8. Содержимое пробирок прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.

9. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
10. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **12 тыс g** (например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf).
11. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
13. Центрифугировать при **12 тыс g** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
15. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
16. Центрифугировать при **12 тыс g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
17. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
18. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
19. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
20. Центрифугировать пробирки при **12 тыс g** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные 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. Для длительного хранения препарат необходимо хранить при температуре не выше минус 16 °C в течение 1 мес или не выше минус 68 °C в течение года.

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Экстракция РНК с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)

В1. Экстракция РНК из 100 мкл образца, лизис вне прибора

Порядок работы

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции РНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для экстракции РНК – плазма (**Plasma**), объем образца (**Volume**) – 0,1 ml, объем элюции (**Eluate**) – 55 mkl, тип образца (**Type**) – **Lysed**, очередность экстракции РНК в образцах (**Priority**) – **normal**.
3. Создать новый протокол экстракции РНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: **On-board Lysis Buffer Dispensing-No, On-board Lysis Incubation-No**.
4. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
5. В ячейки картриджа easyMAG, предназначенные для экстракции РНК в приборе NucliSENS easyMAG, внести по 450 мкл буфера для лизиса NucliSens.
6. В каждую ячейку добавить 100 мкл исследуемой плазмы отдельным наконечником с фильтром, тщательно перемешать пипетированием.
7. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (ПК-1, ПК-2)**. Для этого в приготовленную ячейку картриджа ПК-1 с буфером для лизиса NucliSens добавить 90 мкл ОКО и 10 мкл ПК-1-ВИЧ, а в приготовленную ячейку картриджа ПК-2 с буфером для лизиса NucliSens добавить 90 мкл ОКО и 10 мкл ПК-2-ВИЧ, тщательно перемешать пипетированием.
8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в ячейку картриджа с буфером для лизиса NucliSens добавить 100 мкл ОКО, тщательно перемешать пипетированием.
9. Оставить картриджи с образцами на 10 мин при комнатной температуре для прохождения лизиса.
10. В отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл смешать магнитную силику NucliSens и ВКО стерильными наконечниками с фильтром (см. табл. 5).

Приготовление смеси магнитной силики и ВКО

Количество образцов для экстракции РНК	Количество магнитной силики NucliSens, (мкл)	Количество ВКО, (мкл)
1	10	10
8	90	90
16	170	170
24 (полная загрузка прибора)	250 (с запасом на 25 проб)	250

11. Добавить в каждую ячейку отдельным наконечником по **20 мкл подготовленной смеси магнитной силики NucliSens и ВКО**. Жидкость в каждой ячейке тщательно перемешать пипетированием с помощью дозатора отдельными наконечниками с фильтром на 1000 мкл.
12. Загрузить картриджи с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции РНК с лизисом образцов вне прибора (**Off board**).
13. После окончания экстракции РНК, извлечь картриджи из прибора и **не позднее 30 мин после окончания процедуры экстракции РНК провести реакцию ОТ-ПЦР**.

Для длительного хранения препарат необходимо перенести в одноразовую пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес или не выше минус 68 °С в течение года.

В2. Экстракция РНК из 100 мкл или 1000 мкл образца с автоматическим лизисом в приборе

Порядок работы

1. Лизис образца происходит в автоматическом режиме в приборе NucliSENS easyMAG. В каждую ячейку картриджа easyMAG, предназначенную для экстракции РНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить 100 мкл или 1 мл исследуемой плазмы отдельным наконечником с фильтром.
2. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (ПК-1, ПК-2)**. Для этого в ячейку картриджа, предназначенную для ПК-1 добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-1-ВИЧ**, а в ячейку картриджа, предназначенную для ПК-2 добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-2-ВИЧ**.
3. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в ячейку картриджа, предназначенную для ОК, добавить **100 мкл ОКО**.
4. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции РНК, следуя инструкции к прибору.

5. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для экстракции РНК – плазма (**Plasma**), объем образца (**Volume**) – **100 mkl** или **1 ml**, в зависимости от объема используемого клинического материала, объем элюции (**Eluate**) – **55 mkl**, тип образца (**Type**) – **Primary**, очередность экстракции РНК в образцах (**Priority**) – **normal**.
6. Создать новый протокол экстракции РНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в приборе: **On-board Lysis Buffer Dispensing – Yes, On-board Lysis Incubation – Yes**.
7. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
8. Загрузить картриджи с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции РНК с лизисом образцов в приборе (**On board**).
9. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении **Instrument State-Idle** (приблизительно 15 мин).
10. В отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл смешать магнитную силику NucliSens и ВКО стерильными наконечниками с аэрозольным барьером (см. табл. 5).
11. Открыть крышку прибора и добавить в каждую ячейку отдельным наконечником по **20 мкл** подготовленной смеси магнитной силики NucliSens и ВКО. Жидкость в каждой ячейке тщательно перемешать пипетированием с помощью дозатора отдельными наконечниками с фильтром на 1000 мкл.
12. Запустить на приборе программу продолжения экстракции РНК.
13. После окончания экстракции РНК, извлечь картриджи из прибора и **не позднее 30 мин после окончания процедуры экстракции РНК провести реакцию ОТ-ПЦР**.

Для длительного хранения препарат необходимо перенести в одноразовую пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес или не выше минус 68 °С в течение года.

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

Г1. Экстракция из 1000 мкл образца плазмы

Порядок работы

1. **Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5** прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 5 мл и одноразовых крышек (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
3. При экстракции РНК из 24 образцов:
 - во флакон с **лизирующим раствором МАГНО-сорб (70 мл)** внести **280 мкл ВКО ВИЧ-М-FRT**, все содержимое пробирки с **компонентом А (0,6 мл)** и все содержимое пробирки с **магнетизированной силикой (0,9 мл)**;
 - закрыть крышку флакона и **аккуратно** перемешать переворачиванием 5-7 раз, избегая образования пены;
 - внести в пробирки на 5 мл по **2,6 мл** подготовленной смеси **лизирующего раствора МАГНО-сорб, ВКО, компонента А и магнетизированной силики**.
4. При экстракции РНК менее чем из 24 образцов:
 - смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл ВКО ВИЧ-М-FRT, компонент А и магнетизированную силику из расчета на одну точку: **10 мкл ВКО ВИЧ-М-FRT, 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	ВКО ВИЧ-М-FRT (мкл)	Компонент А (мкл)	Магнетизированная силика (мкл)
6	70	140	210
12	130	260	390
18	190	380	570

 - внести в пробирки на 5 мл по **60 мкл** подготовленной смеси **ВКО ВИЧ-М-FRT, компонента А и магнетизированной силики**;
 - внести в пробирки на 5 мл по **2,6 мл** **лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
5. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **1 мл исследуемого образца плазмы**, перемешать пипетированием и закрыть крышкой.
6. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (ПК-1, ПК-2)**. Для этого в приготовленную пробирку ПКО-1 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-1-ВИЧ**, а в приготовленную пробирку ПКО-2

- с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-2-ВИЧ**, перемешать пипетированием и закрыть крышкой.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
 8. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С на 10 мин.**
 9. Перенести пробирки в магнитный штатив на **6 мин.**
 10. Используя наконечники без фильтра на 1000 мкл, осторожно, по стенке пробирки отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
 11. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**, пробирки закрыть крышкой.
 12. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительные контроли экстракции) и промаркировать их.
 13. Ресуспендировать магнитный носитель со стенок осторожным вортиксированием, а затем пипетированием, и перенести всю жидкость в приготовленные пробирки на 1,5 мл. На вортексе осадить капли жидкости с крышек и стенок пробирок.
 14. Переставить пробирки в магнитный штатив и инкубировать **2 мин.**
 15. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.
 16. Добавить **700 мкл раствора для отмывки 5**, ресуспендировать магнитный носитель, и повторить пп. 14-15.
 17. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6**.
 18. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7**, перемешать, а затем коротко осадить капли на вортексе.
 19. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную жидкость.
 20. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин.**
 21. Добавить **50 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе.
 22. Поместить пробирки в термостат при температуре **60 °С на 5 мин**, через 2 мин перемешать на вортексе.
 23. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК.

ЭКСТРАКЦИЯ 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 и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес, или не выше минус 68 °С в течение года.

Г2. Экстракция из 200 мкл образца плазмы

Порядок работы

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительные контроли экстракции) и промаркировать их.
3. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл ВКО ВИЧ-М-FRT, компонент А и магнетизированную силику из расчета на одну точку: **10 мкл ВКО ВИЧ-М-FRT, 10 мкл компонента А и 20 мкл магнетизированной силики**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции РНК	ВКО ВИЧ-М-FRT (мкл)	Компонент А (мкл)	Магнетизированная силика (мкл)
6	70	70	140
12	130	130	260
18	190	190	380
24	250	250	500

4. Внести в пробирки по **40 мкл** подготовленной смеси ВКО ВИЧ-М-FRT, компонента А и магнетизированной силики.
5. Внести в пробирки **900 мкл** лизирующего раствора МАГНО-сорб.
6. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **200 мкл** исследуемого образца плазмы и перемешать на вортексе.
7. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (ПК-1 и ПК-2)**. Для этого в приготовленную пробирку ПКО-1 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-1-ВИЧ**, а в приготовленную пробирку ПКО-2 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-2-ВИЧ**, перемешать на вортексе.
8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать

на вортексе.

9. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °C на 10 мин.**
10. На вортексе осадить капли жидкости с крышек и стенок пробирок, открыть крышки и перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин.**
11. Осторожно, по внутренней стенке пробирки отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
12. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5.**
13. Перемешать магнетизированную силику вортексированием, а затем осадить капли кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).
14. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин.**
15. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.
16. Повторить отмывку **раствором для отмывки 5** (пп. 12-15).
17. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6.**
18. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7**, перемешать, а затем осадить капли на вортексе. Поставить пробирки в обычный штатив и открыть крышки.
19. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную жидкость.
20. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин.**
21. Добавить **50 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе.
22. Поместить пробирки в термостат при температуре **60 °C на 5 мин**, через 2 мин перемешать на вортексе.
23. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин.** Надосадочная жидкость содержит очищенные 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 °C. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °C в течение 1 мес или не выше минус 68 °C в течение года.

Г3. Экстракция нуклеиновых кислот с помощью автоматической станции (например, с помощью роботизированной станции для дозирования жидкостей Xiril (Xiril AG, Швейцария)

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» совместим с открытыми автоматическими станциями выделения нуклеиновых кислот, использующими принцип намагничивания сорбента для эффективного отделения его от растворов, используемых в процессе экстракции. В этом случае, программирование протокола экстракции осуществляется по инструкции изготовителя автоматической станции в соответствии с последовательностью этапов, объемами реактивов и продолжительностью инкубаций, описанных выше в пп. Г1 и Г2 для комплекта реагентов «МАГНО-сорб».

ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Порядок работы при использовании комплектов для экстракции РНК, не входящих в состав данного набора реагентов (при работе с формой 5)

Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с **формой 5** гарантируются только в случае экстракции РНК при помощи комплектов реагентов рекомендованных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (см. также методические рекомендации по применению набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT»).

В случае, если коэффициент В для используемого комплекта реагентов/автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот не указан во вкладыше, прилагаемому к набору реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT», необходимо провести калибровку самостоятельно.

Калибровка необходима для определения коэффициента В и производится при первой постановке набора данной серии. Калибровка осуществляется один раз для каждой новой серии набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT» и проводится на используемом для экстракции РНК комплекте реагентов/автоматической станции.

Для проведения калибровки необходимо при первой постановке набора реагентов данной серии провести анализ 5 дополнительных точек: дополнительный повтор ПКО-1, дополнительный повтор ПКО-2 и калибратор *HIV-Q* в трех повторях.

Подготовка калибратора *HIV-Q* к работе

1. Осадить на вортексе содержимое пробирки **калибратор *HIV-Q***, аккуратно открыть крышку и, избегая распыления содержимого, добавить **400 мкл растворителя Q**.
2. Плотнo закрыть пробирку и оставить ее на 20 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая на вортексе.
3. После полного растворения осадить содержимое пробирки **калибратор *HIV-Q*** на вортексе в течение 3-5 с для сброса капель с крышки.

Калибровку необходимо проводить на используемом для экстракции РНК комплекте реагентов. Процедура экстракции РНК проводится в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов/автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот. Обязательным условием является внесение ВКО в образцы или лизирующий раствор до начала экстракции в объеме 10 мкл на одну пробу.

В случае если экстракция РНК проводится из 100 мкл плазмы – внести по 100 мкл растворенного калибратора *HIV-Q* в три пробирки для экстракции нуклеиновых кислот.

В случае если экстракция РНК проводится из прочего объема плазмы (100-1000 мкл) – внести в три пробирки, подготовленные для экстракции РНК, по 100 мкл растворенного калибратора *HIV-Q* и довести растворителем *Q* объем образца до используемого объема экстракции нуклеиновых кислот (например: при экстракции из 1 мл внести – 100 мкл растворенного калибратора *HIV-Q* и 900 мкл растворителя *Q*).

После окончания экстракции РНК провести реакцию ОТ-ПЦР в соответствии с данной инструкцией.

Средние значения концентрации по каналам FAM и JOE/HEX полученные для трех повторов калибратора *HIV-Q* использовать в количественных расчетах для определения коэффициента *B* по следующей формуле:

$$\text{Коэффициент } B = \frac{\text{число копий кДНК ВКО (канал FAM) в калибраторе } HIV-Q}{\text{число копий кДНК ВИЧ (канал JOE/HEX) в калибраторе } HIV-Q} \times \text{коэффициент } C$$

Коэффициент *C* указан во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT» данной серии.

ВНИМАНИЕ! Вычисленное значение коэффициента *B* должно укладываться в диапазон указанный во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT» данной серии.

Вычисленное значение коэффициента *B* записать во вкладыш для данной серии набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT» и использовать для расчета концентрации РНК ВИЧ в исследуемых и контрольных образцах (см. раздел «Анализ и учет результатов», а также методические рекомендации по применению набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT» ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Значения, вычисленные для ПКО-1 и ПКО-2, записать во вкладыш для данной серии набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT», найти среднее значение для ПКО-1 и среднее значение для ПКО-2. Установить диапазон допустимых значений для ПКО-1 и ПКО-2: от «вычисленное среднее значение»/3 до «вычисленное среднее значение» x 3. Например: вычисленные значения для двух повторов ПКО-1 = 500000 копий/мл и 700000 копий/мл, тогда среднее вычисленное значение ПКО-1 = 600000 копий/мл, а диапазон допустимых значений для ПКО-1 = 200000-1800000 копий/мл. Вычисленные значения диапазонов допустимых значений для ПКО-1 и ПКО-2 записать во вкладыш и использовать для контроля следующих постановок данной серии набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT» (см. раздел «Анализ и интерпретация результатов»).

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению



Код партии



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Верхнее ограничение температуры



Дата изготовления



Изготовитель

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 39
тридцать девять листов

Заместитель директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора (Доверенность № 8 от 28.11.2018 г.)

« 14 » октября 2019 г.



А.В. Горелов

