

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от «___» _____ 2008 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»



В.Г. Нестеренко

« 18 » марта 2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению «**Abbott RealTime ВИЧ-1**»

Набор реагентов *in vitro* для определения вирусной нагрузки ВИЧ (вируса иммунодефицита человека) методом ПЦР в режиме реального времени.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Abbott RealTime ВИЧ-1», далее по тексту – Набор, предназначен для проведения *in vitro* обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с целью определения количества Вируса Иммунодефицита Человека первого типа (ВИЧ-1) в плазме крови ВИЧ-1-инфицированных пациентов.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Набор Abbott RealTime ВИЧ-1 рекомендуется для использования в соответствии с клиническими рекомендациями и в сочетании с другими лабораторными маркерами в качестве индикатора протекания болезни, а также в качестве вспомогательного теста при оценке вирусного ответа на антиретровирусную терапию, определяющегося изменением уровня РНК ВИЧ-1 в плазме крови. Данный набор не предназначен для использования в качестве скринингового теста для ВИЧ-1 или в качестве диагностического теста для подтверждения ВИЧ-1-инфекции.

СОДЕРЖАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Вирус Иммунодефицита Человека (ВИЧ) является этиологическим агентом Синдрома Приобретенного Иммунодефицита (СПИДа)^{1,2,3}. Он может передаваться половым путем, через инфицированную кровь или продукты крови, или от инфицированной матери плоду⁴. Острый период ВИЧ-инфекции, симптомы которого сходны с симптомами гриппа, развивается через три-пять недель после заражения и характеризуется высокими уровнями вирусемии^{5,6}. Иммунный ответ на ВИЧ-инфекцию поддается обнаружению спустя четыре-шесть недель после появления симптомов^{7,8}.

После сероконверсии вирусная нагрузка в периферической крови снижается, и у большинства пациентов инфекция переходит в асимптоматическую фазу, которая может продолжаться более 9 лет⁹. Количественное измерение уровня вирусной нагрузки ВИЧ в периферической крови весьма способствует пониманию патогенеза ВИЧ-инфекции^{10,11} и, как было показано, является существенным параметром в прогнозировании и управлении ВИЧ-инфекцией¹²⁻¹⁷. Решения, касающиеся начала или изменения антиретровирусной терапии, принимаются на основании данных об уровне вирусной РНК в плазме (вирусная нагрузка), количестве CD4+ Т-клеток и клиническом состоянии пациента^{17,18}. Цель антиретровирусной терапии – снизить количество вирусных частиц ВИЧ в плазме до наиболее низкого уровня, выявляемого имеющимися в наличии тестами на определение вирусной нагрузки^{17,19}.

Уровень РНК ВИЧ в плазме может определяться методом амплификации нуклеиновых кислот или методом амплификации сигнала^{20,21,22}. В наборе Abbott RealTime ВИЧ-1 используется метод Полимеразной Цепной Реакции (ПЦР) с гомогенной флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени.

Дизайн двуцепочечных флуоресцентно-меченых проб позволяет проводить детекцию изолятов ВИЧ различных субтипов группы М и группы О. Данная тест-система стандартизирована относительно вирусного стандарта Лаборатории Гарантии Качества в Вирусологии (VQA) Группы Клинических Испытаний СПИД и относительно 1-го Международного Стандарта РНК ВИЧ-1 Всемирной Организации Здравоохранения (97/656)^{24,25}. Результаты анализа могут быть представлены в копиях/мл или в Международных Единицах/мл (МЕ/мл).

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

Набор Abbott RealTime ВИЧ-1 состоит из трех наборов реагентов:

- **Набор реагентов для проведения амплификации Abbott RealTime ВИЧ-1 Amplification Reagent Kit**
- **Контрольный набор реагентов Abbott RealTime ВИЧ-1 Control Kit**
- **Калибровочный набор реагентов Abbott RealTime ВИЧ-1 Calibrator Kit**

В наборе Abbott RealTime ВИЧ-1 используется технология ОТ-ПЦР²⁶ для амплификации РНК ВИЧ-1 из клинических образцов. В начале процесса пробоподготовки в каждый образец вносится последовательность РНК, неродственная последовательности ВИЧ-1. Эта неродственная последовательность РНК амплифицируется совместно с последовательностью ВИЧ-1 и выступает в качестве внутреннего контроля (ВК), подтверждающего правильность протекания реакции ОТ-ПЦР в каждом образце. Количество РНК ВИЧ-1, присутствующее в каждом цикле амплификации, измеряется с помощью флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных проб на приборе Abbott *m2000rt*TM. До тех пор, пока проба особым образом не свяжется с амплифицированным продуктом, она не образует сигнал. Цикл амплификации, на котором флуоресцентный сигнал регистрируется аппаратом Abbott *m2000rt*, пропорционален логарифму концентрации РНК ВИЧ-1 в анализируемой плазме.

Пробоподготовка

Цель процесса пробоподготовки – выделить и сконцентрировать молекулы РНК для дальнейшей амплификации и удалить потенциальные ингибиторы амплификации. В автоматической системе пробоподготовки Abbott *m*TM Sample Preparation System (4 x 24 Preps) используется технология магнитных частиц для связывания с нуклеиновыми кислотами и последующее промывание частиц для удаления не связавшихся компонентов. Затем связанные нуклеиновые кислоты элюируются и переносятся в чистые пробирки или 96-луночный планшет. С этого момента нуклеиновые кислоты могут использоваться для процесса амплификации. Внутренний контроль проходит через все этапы пробоподготовки вместе с калибраторами, контролями и клиническими образцами.

Для приготовления образцов для набора Abbott RealTime ВИЧ-1 могут использоваться две автоматические системы пробоподготовки Abbott *m2000sp*TM или Abbott *m1000*TM. Аппарат Abbott *m2000sp* обеспечивает автоматический процесс переноса образцов и постановки реакции в оптических реакционных 96-луночных планшетах Abbott 96-Well Optical Reaction Plate, а при работе с аппаратом Abbott *m1000* System перенос образцов и постановка реакции производятся вручную.

Приготовление реагентов и сборка реакционных планшето

Аппарат Abbott *m2000sp* смешивает компоненты реакционной смеси Abbott RealTime ВИЧ-1 для проведения реакции амплификации (ВИЧ-1 олигонуклеотиды, термостабильную полимеразу *rTth* и активирующий реагент). Затем аппарат Abbott *m2000sp* вносит определенное количество полученной смеси мастер-микс в ячейки 96-луночного оптического планшета Abbott 96-Well Optical Reaction Plate вместе с аликвотами нуклеиновых кислот, выделенных аппаратом Abbott *m2000sp*. Планшет вручную

закрывается специальной оптической крышкой, после чего он готов к переносу в аппарат Abbott *m2000rt*.

При работе на аппарате Abbott *m1000 System* смешивание компонентов реакционной смеси Abbott RealTime ВИЧ-1 и внесение аликвот полученной смеси мастер-микс и нуклеиновых кислот в реакционный планшет производятся вручную. Планшет закрывается оптической крышкой и переносится в аппарат Abbott *m2000rt*.

Амплификация

В ходе реакции амплификации, протекаемой в аппарате Abbott *m2000rt*, на основании РНК ВИЧ проводится синтез кДНК благодаря обратной транскриптазной активности термостабильной ДНК-полимеразы *rTth*.

На первом этапе праймеры для обратной транскрипции отжигаются на соответствующих участках генома ВИЧ и внутреннего контроля, и далее, во время пролонгированного периода инкубации, происходит синтез комплементарной цепи ДНК.

После этапа денатурации, при котором температура реакции превышает точку плавления комплекса двуцепочечная кДНК:РНК, на цепь кДНК отжигается второй праймер, и, благодаря ДНК-полимеразной активности фермента *rTth*, происходит синтез двуцепочечного продукта ДНК. Во время каждого цикла продукты амплификации под действием высокой температуры распадаются на отдельные цепи, способствуя отжигу праймеров и последующей элонгации растущих цепей при понижении температуры. Экспоненциальная амплификация продукта достигается многократным повторением цикла высоких и низких температур, что приводит к амплификации анализируемой последовательности в миллион и более раз. В одной и той же реакции происходит одновременная амплификация последовательностей ВИЧ-1 и внутреннего контроля.

В качестве мишени в наборе Abbott RealTime ВИЧ-1 выступает последовательность региона *pol* генома ВИЧ-1. Этот регион является высококонсервативным²⁷. Праймеры разработаны таким образом, чтобы они могли гибридизироваться с регионом *pol* даже при наличии небольшого количества отличающихся нуклеотидов у различных субтипов ВИЧ.

Последовательность внутреннего контроля представляет собой ген гидроксипируват редуктазы из тыквы, *Cucurbita pepo*, обработанный частицами Armored RNA®, что приводит к его растворению в отрицательной плазме человека.

Детекция

Во время циклов считывания результатов амплификации аппаратом Abbott *m2000rt*, температура продолжает понижаться, способствуя флуоресцентной детекции амплифицированных продуктов, происходящей по мере того, как пробы ВИЧ-1 и ВК отжигаются со своими мишенями (флуоресцентная детекция в реальном времени). Проба ВИЧ-1 имеет флуоресцентную часть, ковалентно связанную с 5'-концом. Короткая олигонуклеотидная

последовательность (гаситель флуоресценции) комплементарна 5'-концу пробы ВИЧ-1 и несет молекулу-гаситель на своем 3'-конце. В отсутствие РНК ВИЧ-1, флуоресценция пробы ВИЧ-1 гасится путем гибридизации с олигонуклеотидом-гасителем. В присутствии РНК ВИЧ-1, проба ВИЧ-1 гибридизируется преимущественно с последовательностью ВИЧ-1, отделяясь от олигонуклеотида-гасителя, что способствует флуоресцентной детекции.

Проба ВК представляет собой одноцепочечный олигонуклеотид с флуорофором на 5'-конце и гасителем на 3'-конце. В отсутствие последовательности ВК, флуоресценция пробы гасится. В присутствии последовательности ВК, гибридизация пробы с комплементарной последовательностью способствует разделению флуорофора и гасителя и, следовательно, процессам флуоресценции и детекции. Пробы ВИЧ-1 и ВК мечены разными флуорофорами, что позволяет проводить в каждом цикле одновременную детекцию обоих амплифицированных продуктов.

Цикл амплификации, при котором флуоресцентный сигнал регистрируется аппаратом Abbott *m2000rt*, пропорционален логарифму концентрации РНК ВИЧ-1 в исходном образце.

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ КОНТАМИНАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Вероятность контаминации нуклеиновых кислот минимальна, так как:

- Обратная транскрипция, ПЦР-амплификация и гибридизация олигонуклеотидов происходят в закрытом 96-луночном планшете.
- Детекция проводится автоматически, без необходимости открывать 96-луночный планшет.
- При постановке реакций для автоматических пипеток используются только наконечники с аэрозольными фильтрами, сбрасываемые после применения.
- Работа с набором Abbott RealTime ВИЧ-1 проводится в специально отведенных помещениях. Подробнее – в разделе ОСОБЫЕ МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ данного руководства.

РЕАГЕНТЫ

Набор реагентов для амплификации Abbott RealTime ВИЧ-1 Amplification Reagent Kit (List No. 2G31-90)

1. Внутренний контроль Abbott RealTime ВИЧ-1 (List No. 2G31Y) (4 пробирки, 1.2 мл в каждой).

< 0.01% неинфекционной Armored РНК внутреннего контроля в отрицательной плазме человека. Отрицательная плазма человека протестирована и не содержит HBsAg, РНК ВИЧ, РНК ВГС, анти-ВИЧ-1/ВИЧ-2, и анти-ВГС.

Консерванты: 0.1% ProClin® 300 и 0.15% ProClin 950.

2. Реагенты для амплификации Abbott RealTime ВИЧ-1 (List No. 2G31)

(4 упаковки, 1 упаковка на 24 теста):

- 1 пробирка (0.141 мл) термостабильная полимераза rTth (от 2.9 до 3.5 единиц/мкл) в буферном растворе.
- 1 пробирка (1.10 мл) олигонуклеотидов ВИЧ-1.
<0.1% синтетических олигонуклеотидов (4 праймера, 2 пробы и 1 олигонуклеотид-гаситель флуоресценции), и < 0.3% dNTPs в буферном растворе с соответствующим красителем. Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.
- 1 пробирка (0.40 мл) активирующего реагента.
30 mM раствор хлорида марганца. Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.

Набор контролей Abbott RealTime ВИЧ-1 Control Kit (List No. 2G31-80)

1. Отрицательный контроль Abbott RealTime ВИЧ-1 (List No. 2G31Z)

(8 пробирок, 1.8 мл в каждой). Отрицательная плазма человека протестирована и не содержит HBsAg, РНК ВИЧ, РНК ВГС, анти-ВИЧ-1/ВИЧ-2, и анти-ВГС.

Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.

2. Слабый положительный контроль Abbott RealTime ВИЧ-1 (List No. 2G31W)

(8 пробирок, 1.8 мл в каждой). Неинфекционная Armored РНК ВИЧ-1 в отрицательной плазме человека. Отрицательная плазма человека протестирована и не содержит HBsAg, РНК ВИЧ, РНК ВГС, анти-ВИЧ-1/ВИЧ-2, и анти-ВГС.

Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.

3. Сильный положительный контроль Abbott RealTime ВИЧ-1 (List No. 2G31X)

(8 пробирок, 1.8 мл в каждой). Неинфекционная Armored РНК ВИЧ-1 в отрицательной плазме человека. Отрицательная плазма человека протестирована и не содержит HBsAg, РНК ВИЧ, РНК ВГС, анти-ВИЧ-1/ВИЧ-2, и анти-ВГС.

Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.

Набор реагентов для калибровки Abbott RealTime ВИЧ-1 Calibrator Kit (List No. 2G31-70)

1. Калибратор А Abbott RealTime ВИЧ-1 (List No. 2G31A)

(12 пробирок, 1.8 мл в каждой). Неинфекционная Armored РНК ВИЧ-1 в отрицательной плазме человека. Отрицательная плазма человека протестирована и не содержит HBsAg, РНК ВИЧ, РНК ВГС, анти-ВИЧ-1/ВИЧ-2, и анти-ВГС.

Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.

2. Калибратор В Abbott RealTime ВИЧ-1 (List No. 2G31B)

(12 пробирок, 1.8 мл в каждой). Неинфекционная Armored РНК ВИЧ-1 в отрицательной плазме человека. Отрицательная плазма человека

протестирована и не содержит HBsAg, РНК ВИЧ, РНК ВГС, анти-ВИЧ-1/ВИЧ-2, и анти-ВГС.

Консерванты: 0.1% ProClin 300 и 0.15% ProClin 950.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Использовать только для диагностики *In Vitro*.

Данный набор не может быть использована в качестве скринингового теста на выявление ВИЧ-1 или в качестве диагностического теста на подтверждение ВИЧ-1 инфекции.

Меры предосторожности

В соответствии с рекомендациями в инструкциях к приборам Abbott *m1000 System*, Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*.

ВНИМАНИЕ: Данный продукт содержит потенциально инфицированные компоненты, в том числе клетки крови человека.

Для более подробной информации обратитесь к разделу РЕАГЕНТЫ данного руководства.

Компоненты, выделенные из тканей человека, протестированы и не содержат HBsAg, РНК ВИЧ, РНК ВГС, анти-ВИЧ-1/ВИЧ-2, и анти-ВГС. Однако ни один из известных тестов не может полностью гарантировать то, что компоненты, изолированные из тканей человека или инактивированных микроорганизмов не способны переносить инфекцию. Поэтому все материалы из тканей человека должны рассматриваться как потенциально инфекционные. Всю работу с такими реагентами и клиническими образцами рекомендуется проводить в соответствии со стандартами по работе с патогенами крови OSHA²⁸. При работе с материалами, которые содержат или могут содержать инфицирующие агенты, должен соблюдаться Уровень Биобезопасности 2²⁹ или другие подходящие меры предосторожности^{30,31}, в частности рекомендуется:

- Использовать перчатки при работе с клиническими образцами и реагентами.
- Не пипетировать при помощи рта.
- Не есть, не пить, не курить, не пользоваться косметикой и не прикасаться руками к контактными линзам в рабочих областях лаборатории.
- При попадании зараженного материала на какую-либо поверхность вымыть и продезинфицировать ее с использованием подходящих дезинфицирующих растворов, например 1.0% раствора гипохлорита натрия^{32,33}.
- Проводить деkontаминацию и удаление всех клинических образцов, реагентов и других потенциально контаминированных материалов в соответствии с местными рекомендациями^{34,35}.

Набор калибраторов, контролей, внутренний контроль, олигонуклеотиды ВИЧ-1 и активирующий реагент набора Abbott RealTime ВИЧ-1 содержат смесь 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он и 2-метил-4-изотиазолин-3-он, веществ, являющихся компонентами ProClin. Эти компоненты классифицированы Директивами Европейского Сообщества как вещества, вызывающие раздражение (Xi).

Далее приводятся обозначения, указывающие на риск (R) и обеспечение безопасности (S) при работе с веществами:

R43 Могут вызывать повышенную чувствительность при контакте с кожей.

S24 Избегать контакта с кожей.

S35 Эти материалы и их компоненты должны уничтожаться безопасным способом.

S37 Использовать перчатки.

S46 При проглатывании немедленно оказать медицинскую помощь и показать врачу упаковку реагента.

ОСОБЫЕ МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Меры предосторожности при работе

При работе с набором Abbott RealTime ВИЧ-1 для хранения клинических образцов и в процессе анализа рекомендуется использовать пробирки с завинчивающейся крышкой, как указано в разделе **СБОР КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ, ИХ ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА К МЕСТУ ИССЛЕДОВАНИЯ**. Для максимального снижения риска перекрестной контаминации между образцами в процессе приготовления образцов, а также для предотвращения случайного внесения рибонуклеаз (РНаз) в образцы во время и после выделения РНК, необходим хороший навык лабораторной практики. При работе с РНК всегда должны применяться соответствующие асептические технологии. Реакции амплификации, такие как ПЦР, чувствительны к случайному попаданию продуктов ранее проведенных реакций амплификации. В том случае, если клинические образцы или реагенты, используемые для проведения реакции ПЦР в реальном времени оказались контаминированы случайным попаданием даже нескольких молекул ранее амплифицированного продукта, возможно получение неверных результатов. Физическое разделение действий, производимых при постановке реакции ПЦР, в сочетании с хорошей лабораторной практикой позволяют значительно снизить риск контаминации.

Рабочие области

Используйте три специальные области в лаборатории при работе с набором Abbott RealTime ВИЧ-1 с использованием аппаратов Abbott m1000 System и Abbott m2000rt:

- **Область приготовления реагентов** используется для приготовления реакционной смеси мастер-микс из компонентов набора Abbott RealTime ВИЧ-1 и для внесения аликвот полученной смеси в реакционный планшет. Лабораторная одежда, пипетки, наконечники для пипеток и вортексы, используемые в **Области приготовления реагентов** должны оставаться в ней и не переноситься в **Область приготовления образцов** или **Область амплификации**.

- **Область приготовления образцов** используется для работы с образцами (клиническими образцами, контролями и калибраторами Abbott RealTime

ВИЧ-1), а также для внесения образцов, контролей и калибраторов в 96-луночные оптические планшеты Abbott 96-Well Optical Reaction Plate. **Все реагенты, используемые в Области приготовления образцов, должны постоянно находиться этой области. Лабораторная одежда, пипетки, наконечники для пипеток и вортексы, используемые в Области приготовления образцов, должны оставаться в ней и не переноситься в Область приготовления реагентов или в Область амплификации. Продукты амплификации не должны попадать в Область приготовления образцов.**

- **Область амплификации** используется для амплификации и детекции амплифицированного продукта. Лабораторная одежда и оборудование, используемые в **Области амплификации**, должны оставаться в ней и не переноситься в **Область приготовления реагентов** и **Область приготовления образцов**.

При применении аппаратов Abbott m2000sp и Abbott m2000rt рекомендуется использование только двух специальных областей, Области приготовления образцов и Области амплификации.

Компоненты каждого набора данного набора реагентов должны использоваться только вместе. Не смешивайте компоненты из разных наборов. Например, не используйте отрицательный контроль из набора контролей лота X с положительным контролем из набора контролей лота Y. Не используйте наборы или реагенты с просроченным сроком годности. Рабочие области и используемые инструменты должны рассматриваться как потенциальные источники контаминации. После контакта с веществами, которые могут рассматриваться в качестве источников контаминации (клинические образцы, элюаты и/или продукты амплификации) необходимо сменить перчатки, прежде чем работать с неоткрытыми реагентами, отрицательным и положительным контролями, калибраторами или образцами. Для правильной очистки приборов обратитесь к руководствам по использованию аппаратов Abbott m1000 System и Abbott m2000sp and m2000rt.

Если процесс работы аппаратов Abbott m1000 System или Abbott m2000sp прерывается, удалите все продукты реакции и реагенты в соответствии с

руководством по использованию приборов Abbott *m1000 System* или Abbott *m2000sp*. Если прерывается протокол внесения реакционной смеси в аппарате Abbott *m2000sp*, поместите 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate в пластиковый пакет и утилизируйте в соответствии с руководством по использованию прибора Abbott *m2000sp*, секция Опасность, вместе с перчатками, используемыми при данной работе.

Деконтаминируйте и утилизируйте все клинические образцы, реагенты и другие материалы, несущие потенциальную биологическую опасность, в соответствии с местными требованиями^{34,35}. Все материалы должны использоваться таким образом, чтобы снизить риск возможной контаминации в рабочих областях.

ВНИМАНИЕ: При автоклавировании закрытого реакционного планшета не происходит деградации амплифицированного продукта, и при последующем открывании планшета может происходить контаминация. Контаминация лабораторных областей амплифицированным продуктом может происходить и в том случае, если утилизируемые материалы неаккуратно собираются и изолируются.

Предотвращение аэрозольной контаминации

Для того, чтобы сократить риск контаминации нуклеиновых кислот при ручном пипетировании, необходимо использовать наконечники с аэрозольными фильтрами. Наконечники не должны использоваться многократно. При попадании клинических материалов или реагентов на какую-либо поверхность необходимо очистить и дезинфицировать ее в соответствии с инструкциями к аппаратам Abbott *m1000 System*, Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*.

Контаминация и ингибирование

Для минимизации риска контаминации РН-азами, перекрестной контаминации между образцами и ингибирования должны соблюдаться следующие меры предосторожности:

- Носить специальную одежду.
- Использовать перчатки без талька.
- Менять перчатки после каждого контакта с веществами, являющимися потенциальными контаминаторами (такими как клинические образцы, элюаты и/или амплифицированные продукты).
- При пипетировании использовать наконечники с аэрозольными фильтрами. Длина наконечника должна быть достаточной для предотвращения контаминации канала автоматической пипетки. Во время пипетирования необходимо избегать соприкосновения канала автоматической пипетки с внутренней поверхностью пробирок с образцами. Рекомендуется использование удлиненных наконечников с аэрозольными фильтрами.
- Меняйте наконечник пипетки при КАЖДОМ переносе раствора.

- Реагенты системы для пробоподготовки Abbott *m*Sample Preparation System (4 x 24 Preps) предназначены только для однократно использования. Для каждой постановки анализа с использованием набора Abbott RealTime ВИЧ-1 используйте новые реагенты и новые пробирки для смешивания реагентов и постановки реакции. После завершения каждой реакции удалите все оставшиеся реагенты в соответствии с инструкциями к аппаратам Abbott *m*1000 System, Abbott *m*2000sp и инструкцией к системе пробоподготовки Abbott *m* Sample Preparation System (4 x 24 Preps).

ТРЕБОВАНИЯ ПО ХРАНЕНИЮ

Набор реагентов для амплификации Abbott RealTime ВИЧ-1 (List No. 2G31-90).

- Пробирки с набором реагентов Abbott RealTime ВИЧ-1 Amplification Reagent Pack и внутренним контролем должны храниться при температуре -10°C или ниже. Не допускать прямого контакта реагентов Abbott RealTime ВИЧ-1 с образцами, калибраторами и контролями.

Набор контролей Abbott RealTime ВИЧ-1 (List No. 2G31-80).

- Отрицательный и положительный контроли Abbott RealTime ВИЧ-1 должны храниться при температуре -10°C или ниже.

Набор калибраторов Abbott RealTime ВИЧ-1 (List No. 2G31-70).

- Калибратор А и калибратор В Abbott RealTime ВИЧ-1 должны храниться при температуре -10°C или ниже.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

- **Набор реагентов для амплификации Abbott RealTime ВИЧ-1:** Транспортировать в сухом льду.
- **Набор контролей Abbott RealTime ВИЧ-1:** Транспортировать в сухом льду.
- **Набор калибраторов Abbott RealTime ВИЧ-1:** Транспортировать в сухом льду.

ИНДИКАЦИЯ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ ПОРЧИ РЕАГЕНТОВ

Если значения положительного или отрицательного контролей отклоняются от ожидаемых результатов, это может указывать на порчу реагентов. В этом случае результаты соответствующих тестов неверны и образцы должны быть протестированы снова. Может потребоваться также перекалибровка прибора.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Перед проведением исследования на аппарат Abbott *m1000 System* должно быть установлено программное обеспечение для анализа нуклеиновых кислот (NAT). За подробной информацией по установке программного обеспечения NAT обратитесь к инструкции по использованию прибора Abbott *m1000 System*. На аппараты Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt* перед проведением исследования должен быть установлен пользовательский файл Abbott RealTime ВИЧ-1 с Abbott RealTime HIV-1 *m2000 System Combined Application* CD-ROM. За подробной информацией обратитесь к инструкциям по использованию приборов Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*.

СБОР ОБРАЗЦОВ, ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА К МЕСТУ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сбор образцов и хранение

Для набора Abbott RealTime ВИЧ-1 могут использоваться клинические образцы плазмы человека (на ACD-A и EDTA).

Сбор плазмы в специальные пробирки производится в соответствии с инструкциями фирм-изготовителей.

Цельная кровь до центрифугирования может храниться не более 6 часов при 15-30°C или не более 24 часов при 2-8°C.

После центрифугирования отделите плазму от клеток. Образцы плазмы могут храниться не более 24 часов при 15-30°C или не более 5 дней при 2-8°C.

Более длительное хранение образцов плазмы допускается при температуре -70°C или ниже^{36,37}. Необходимо избегать многократного размораживания плазмы. Размораживайте образцы плазмы при температуре 15-30°C или при 2-8°C. Размороженные образцы плазмы могут храниться при 2-8°C не более 6 часов.

Мутные образцы, или образцы, в которых наблюдаются твердые частицы, перед исследованием необходимо отцентрифугировать при 2,000 g в течение 5 минут.

Транспорт образцов

Транспортируйте замороженные образцы в сухом льду. Для местных и международных перевозок образцы должны быть упакованы и промаркированы в соответствии с местными и международными требованиями для транспортировки клинических образцов и этиологических/инфицирующих агентов.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРА Abbott RealTime ВИЧ-1

Данное руководство Abbott RealTime ВИЧ-1 включает два протокола исследования:

- При приготовлении образцов для амплификации с использованием аппарата Abbott *m1000 System* следуйте **ПРОТОКОЛУ I**.
- При приготовлении образцов для амплификации с использованием аппарата Abbott *m2000sp* следуйте **ПРОТОКОЛУ II**.

Тест-система Abbott RealTime ВИЧ-1 позволяет работать с тремя объемами образцов (0.2 мл, 0.5 мл, and 1.0 мл). (Смотри ступень протокола 6 и раздел **Интерпретация Результатов**).

Поставляемые материалы:

- набор реагентов для амплификации Abbott RealTime ВИЧ-1 Amplification Reagent Kit (List No. 2G31-90)

Требуемые, но не поставляемые материалы:

- Набор калибраторов Abbott RealTime HIV-1 Calibrator Kit (List No. 2G31-70)
- Набор контролей Abbott RealTime HIV-1 Control Kit (List No. 2G31-80)

Для Области приготовления образцов при использовании аппарата Abbott *m1000 System*:

- Аппарат Abbott *m1000 System*
- Система пробоподготовки Abbott *m Sample Preparation System* (4 x 24 Preps) (List No. 4J70-24)
- Реакционные пробирки
- Автоматические пипетки на 20-1000 мкл
- Наконечники с аэрозольными фильтрами для пипеток на 20-1000 мкл
- 11.6 - 16 мм пробирки для образцов
- Наконечники для пипеток на 200 мкл и 1000 мкл
- Реакционные планшеты с глубокими лунками Abbott 96 Deep-Well Plate
- Вортекс
- Оптические липкие крышки Abbott Optical Adhesive Covers
- Аппликаторы для крышек Abbott Adhesive Cover Applicators
- Брызгогаситель Abbott Splash-Free Support Base
- Кюветы для реагентов Reagent Troughs
- Пробирки на 1.5 мл

Для Области приготовления образцов при использовании аппарата Abbott *m2000sp*:

- Аппарат Abbott *m2000sp*
- Система пробоподготовки Abbott *m Sample Preparation System* (4 x 24 Preps) (List No. 4J70-24)
- Реакционные пробирки на 5 мл
- Автоматические пипетки на 20-1000 мкл
- Наконечники с аэрозольными фильтрами для пипеток на 20-1000 мкл
- 10.0 - 16 мм пробирки для образцов
- Наконечники для пипеток на 200 мкл и 1000 мкл

- Вортекс
- Оптические липкие крышки Abbott Optical Adhesive Covers
- Аппликаторы для крышек Abbott Adhesive Cover Applicators
- Брызгогаситель Abbott Splash-Free Support Base
- Пробирка для смеси мастер-микс
- Реакционные пробирки на 200 мл
- Реакционные планшеты с глубокими лунками Abbott 96 Deep-Well Plate
- Abbott RealTime HIV-1 *m2000* System Combined Application CD-ROM (List No. 1L68)
- Оптические 96-луночные реакционные планшеты Abbott 96-Well Optical Reaction Plate

Для области приготовления реагентов при использовании аппарата Abbott *m1000*

- Кулер StrataCooler® 96 Benchtop Cooler
- Оптические 96-луночные реакционные планшеты Abbott 96-Well Optical Reaction Plate
- Автоматические пипетки на 20-1000 мкл
- Наконечники с аэрозольными фильтрами для пипеток на 20-1000 мкл
- Однократно используемые, свободные от РНКаз/ДНКаз пробирки или контейнеры
- Вортекс

Для области амплификации при использовании аппарата Abbott *m2000rt*

- Аппарат Abbott *m2000rt*
- Abbott RealTime HIV-1 *m2000* System Combined Application CD-ROM (List No. 1L68)
- Оптический калибровочный набор Abbott *m2000rt* Optical Calibration Kit (List No. 4J71-93)

Другие материалы:

- Биобезопасный ламинар, подходящий для работы с инфицированными материалами
- Пластиковые мешки для мусора
- Вода, свободная от РНаз (Eppendorf или эквивалентная)†
- Микроцентрифужные пробирки на 1.7 мл, свободные от РНКаз (Dot Scientific, Inc. или эквивалентные)†
- Стерильные ватные палочки Cotton Tip Applicators (Puritan или эквивалентные)†

†Замечание: Три последние позиции необходимы для процедуры **Мониторинга лаборатории на присутствие контаминации**. Для подробной информации обратитесь к разделу **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА** данного руководства.

Меры предосторожности при проведении процедуры

Перед проведением исследования внимательно прочитайте все вложенные инструкции. Калибраторы набора Abbott RealTime ВИЧ-1, Внутренний контроль, Отрицательный контроль, Слабый положительный контроль и Сильный положительный контроль предназначены только для однократного использования и должны быть утилизированы после использования.

При пипетировании образцов, ВК и реагентов для амплификации необходимо каждый раз использовать новые наконечники для пипеток с аэрозольными фильтрами. Чтобы предотвратить возможность контаминации канала автоматической пипетки, важно не допускать соприкосновения канала пипетки с внутренней стороной пробирок или контейнеров с образцами. Для работы рекомендуется использовать удлиненные наконечники с аэрозольными фильтрами.

Принцип проведения мониторинга на присутствие амплифицированных продуктов описан в разделе **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА** данного руководства. Для того чтобы снизить риск контаминации нуклеиновых кислот, при попадании зараженного материала на какую-либо поверхность необходимо вымыть и продезинфицировать ее с использованием подходящих дезинфицирующих растворов, например 1.0% раствора гипохлорита натрия. Калибраторы и контроли набора Abbott RealTime ВИЧ-1 должны готовиться одновременно с тестируемыми образцами. Использование Контролей и Калибраторов набора Abbott RealTime ВИЧ-1 существенно при проведении данного исследования. Для подробной информации обратитесь к разделу **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА** данного руководства.

ПРОТОКОЛ I: Использование аппаратов ABBOTT *m1000 SYSTEM* и *m2000rt*

Для подробного описания принципов проведения исследований на аппаратах Abbott *m1000 System* и Abbott *m2000rt* обратитесь к инструкциям по их использованию, раздел Инструкция по работе с прибором.

Персонал лаборатории должен быть обучен работе на приборах Abbott *m1000 System* и Abbott *m2000rt*. Операторы должны иметь хорошую лабораторную практику и в полном объеме знать программное обеспечение приборов.

1. Разморозьте контроли тест-системы и внутренний контроль при температуре 15-30°C или при 2-8°C. В том случае, если необходимо откалибровать прибор, разморозьте калибраторы при температуре 15-30°C или при 2-8°C; смотрите раздел **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА** данного руководства.

- После размораживания контроли тест-системы, внутренний контроль и калибраторы можно хранить при температуре 2-8°C не более 24 часов.
- Перед использованием перемешайте каждый калибратор и контроль на вортексе три раза в течение 2-3 секунд. Убедитесь, что после

перемешивания содержимое каждой пробирки находится на дне пробирки, в противном случае постучите пробиркой о стол, чтобы сбросить содержимое на дно.

2. Разморозьте реагенты для амплификации при 15-30°C или при 2-8°C и храните их до использования при температуре 2-8°C.

- После размораживания реагенты для амплификации можно хранить при температуре 2-8°C не более 24 часов.

ВНИМАНИЕ: Для проведения 24 реакций используйте один флакон лизисного буфера *mLysis Buffer*, одну пробирку с внутренним контролем и одну упаковку с реагентами для амплификации RealTime ВИЧ-1. Используйте второй набор реагентов для проведения от 25 до 48 реакций. Максимально за одну постановку можно провести 48 реакций.

Область приготовления образцов

3. Перемешайте содержимое пробирок Abbott *m* Sample Preparation осторожным переворачиванием.

Если после открывания пробирок с реагентами в содержимом наблюдаются кристаллы, оставьте пробирки при комнатной температуре до полного растворения кристаллов. Не используйте реагенты до тех пор, пока кристаллы не растворятся полностью.

4. Перемешайте каждый внутренний контроль на вортексе три раза в течение 2-3 секунд перед использованием.

5. Внесите 500 мкл внутреннего контроля в каждый флакон лизисного буфера *mLysis Buffer*. **ДЛЯ ВНЕСЕНИЯ ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЯ ИСПОЛЬЗУЙТЕ ТОЧНО ОТКАЛИБРОВАННЫЕ ПИПЕТКИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ТОЛЬКО НА ЭТОМ ЭТАПЕ.** Перемешайте, аккуратно переворачивая флакон 5 – 10 раз, чтобы избежать сильного вспенивания.

6. **Максимально за одну постановку можно провести 48 реакций.** В каждую постановку включаются отрицательный контроль, слабый положительный контроль и сильный положительный контроль, что снижает максимальное количество исследуемых образцов до 45 за одну постановку.

- Минимальные объемы образцов, используемые в наборе Abbott RealTime ВИЧ-1 и связанные с этим требования к размеру ячеек Abbott *m1000 System* следующие:

Размер ячейки	Диаметр пробирки*	Минимальный объем образца для анализа в наборе Abbott RealTime ВИЧ-1		
		0.2 мл	0.5 мл	1.0 мл
10 мм	10.0 мм – 11.5 мм	0.5 мл	0.8 мл	1.3 мл
13 мм	11.6 мм – 14.0 мм	0.7 мл	1.0 мл	1.5 мл
16 мм	15.0 мм – 16.0 мм	1.0 мл	1.3 мл	1.8 мл

* внешний диаметр пробирки

- Если образцы были заморожены, разморозьте их при температуре 15-30°C или при 2-8°C. Размороженные образцы можно хранить при температуре 2-8°C не более 6 часов.
- Перемешайте каждый образец на вортексе три раза в течение 2-3 секунд перед загрузкой в аппарат Abbott *m1000* System. **Мутные образцы и образцы, в которых наблюдается наличие твердых частиц, перед исследованием необходимо отцентрифугировать при 2,000 g в течение 5 минут.** Перенести необходимое количество исследуемого образца в чистую пробирку, если это необходимо. Для информации о размере реакционных пробирок, обратитесь к инструкции по использованию прибора Abbott *m1000*. Не прикасайтесь к внутренней поверхности крышек при открывании пробирок.

7. Поместите калибраторы (если это необходимо), слабый и сильный положительные контроли, отрицательный контроль и исследуемые образцы в ячейки для образцов аппарата Abbott *m1000*. Следуйте указаниям исследовательского протокола, как описано в инструкции по использованию аппарата Abbott *m1000*, раздел Инструкция по работе с прибором.

8. Поместите реакционные пробирки в 1-миллилитровую каретку подсистемы *m1000*.

9. Загрузите реагенты системы пробоподготовки Abbott *m* Sample Preparation System и 1.5-миллилитровые пробирки для сбора образцов в аппарат Abbott *m1000* System, как описано в инструкции по использованию аппарата Abbott *m1000*, раздел Инструкция по работе с прибором.

10. Запустите исследовательский протокол аппарата Abbott *m1000*, как описано в инструкции по использованию аппарата Abbott *m1000*, раздел Инструкция по работе с прибором. Выберите вариант анализа, соответствующий объему тестируемого образца.

- **Смешивание реактивов для амплификации (приготовление мастер-микса) и элюирование образцов в Оптический 96-луночный**

реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate (пункт 17) должно начаться в течение одного часа после завершения процесса пробоподготовки.

Область амплификации

11. Включите и запустите аппарат Abbott *m2000rt*.

Замечание: Аппарат Abbott *m2000rt* должен прогреться в течение 15 минут.

12. Создайте файл постановки реакции (*m2000rt test order*). За подробной информацией обратитесь к инструкции по использованию аппарата *m2000rt*, раздел Инструкция по работе с прибором. Выберите вариант анализа, соответствующий объему тестируемого образца.

- Внесите в файл постановки реакции значения лотов калибраторов (в том случае, если необходимо провести калибровку прибора) и контролей для правильной калибровки прибора и оценки результатов. Значения лотов указаны на ярлыке набора калибраторов и контролей Abbott RealTime ВИЧ-1.

Область приготовления реагентов

Приготовление реагентов должно осуществляться в специальной Области Приготовления Реагентов. Перед приготовлением реагентов изучите раздел Меры предосторожности при работе данного руководства.

ВНИМАНИЕ: Смените перчатки перед работой с реагентами для амплификации.

13. Приготовьте смесь мастер-микс для амплификации.

- Каждая упаковка реагентов для амплификации рассчитана на 24 реакции.
- Перед открыванием пробирок с реагентами для амплификации, убедитесь, что содержимое находится на дне пробирки, в противном случае постучите пробиркой о стол, так, чтобы сбросить содержимое на дно.
- В пробирку с термостабильной ДНК-полимеразой *rTth* (реагент 3) внесите 271 мкл ВИЧ-1 активирующего реагента (реагент 1) и 949 мкл олигонуклеотидов ВИЧ-1 (реагент 2). Для приготовления реакционной смеси используйте автоматические пипетки, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ТОЛЬКО НА ЭТОМ ЭТАПЕ.
- Если необходимо провести более 24 реакций (25-48 реакций), приготовьте вторую смесь мастер-микс из второй упаковки реагентов для амплификации.

- **Протокол аппарата *m2000rt* (пункт 20) должен быть запущен в течение 40 минут после добавления активирующего реагента в пробирку с полимеразой *rTth* (пункт 13).**

14. Перенесите смесь мастер-микс в однократно используемую, свободную от РНКаз/ДНКаз пробирку и смешайте на вортексе.

15. Поместите 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate в кулер StrataCooler 96 как указано в инструкции к кулеру StrataCooler 96. Внесите по 50 мкл смеси мастер-микс для амплификации в ячейки 96-луночного оптического реакционного планшета. Можно использовать откалиброванную многоканальную пипетку. Используйте автоматические пипетки, применяемые ТОЛЬКО НА ДАННОМ ЭТАПЕ.

16. Перенесите 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate, находящийся в кулере StrataCooler 96 в Область приготовления образцов.

Область приготовления образцов

17. В области приготовления образцов внесите по 50 мкл элюата образцов в ячейки 96-луночного оптического реакционного планшета Abbott 96-Well Optical Reaction Plate, находящегося в кулере StrataCooler 96. **Для внесения каждого образца используйте отдельный наконечник для пипетки.** Во время переноса каждого образца смешайте компоненты реакции пипетированием 3-5 раз.

18. Заклейте 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate в соответствии с инструкцией к аппарату Abbott *m2000rt*.

19. Переместите 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate из кулера StrataCooler 96 в брызгогаситель Abbott Splash Free Support Base и перенесите его в Область Амплификации.

ВНИМАНИЕ: Не переносите кулер StrataCooler 96 в Область Амплификации.

Область амплификации

20. Поместите 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate в аппарат Abbott *m2000rt*. Выберите вариант анализа, соответствующий объему тестируемого образца. Запустите протокол анализа Abbott RealTime ВИЧ-1, в соответствии с инструкцией по использованию аппарата Abbott *m2000rt*, раздел Инструкция по работе с прибором.

ПРОЦЕДУРЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Очистите кулер StrataCooler 96 в соответствии с инструкцией к StrataCooler 96 и верните в Область Приготовления Реагентов.
2. Удалите 1.5-миллилитровые пробирки из аппарата Abbott *m1000* и утилизируйте в соответствии с инструкцией к прибору Abbott *m1000*.
3. Поместите 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate в пластиковый контейнер и утилизируйте в соответствии с инструкцией к прибору Abbott *m2000rt* вместе с перчатками, используемыми при данной работе.
4. Очистите брызгогаситель Abbott Splash Free Support Base перед следующим использованием в соответствии с инструкцией к прибору Abbott *m2000rt*.

ПРОТОКОЛ II: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АППАРАТОВ АББОТТ *m2000sp* и *m2000rt* INSTRUMENT

Для подробного описания принципов проведения исследований на аппаратах Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt* обратитесь к инструкциям по их использованию, раздел Инструкция по работе с прибором.

Персонал лаборатории должен быть обучен работе на приборах Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*. Операторы должны иметь хорошую лабораторную практику и в полном объеме знать принципы работы приборов.

1. Разморозьте контроли набора и внутренний контроль при температуре 15-30°C или при 2-8°C. В том случае, если необходимо откалибровать прибор, разморозьте калибраторы при температуре 15-30°C или при 2-8°C; смотрите раздел **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА** данного руководства.

- После размораживания контроли набора, внутренний контроль и калибраторы можно хранить при температуре 2-8°C не более 24 часов.
- Перед использованием перемешайте каждый калибратор и контроль на вортексе три раза в течение 2-3 секунд. Убедитесь, что после перемешивания содержимое каждой пробирки находится на дне пробирки, в противном случае постучите пробиркой о стол, чтобы сбросить содержимое на дно.

2. Разморозьте реагенты для амплификации при 15-30°C или при 2-8°C и храните их до использования при температуре 2-8°C.

- После размораживания реагенты для амплификации можно хранить при температуре 2-8°C не более 24 часов.

ВНИМАНИЕ: Для проведения 24 реакций используйте один флакон лизисного буфера *mLysis Buffer*, одну пробирку с внутренним контролем и одну упаковку с реагентами для амплификации RealTime ВИЧ-1. Используйте второй набор реагентов для проведения от 25 до 48 реакций. Максимально за одну постановку можно провести 48 реакций.

3. Перемешайте содержимое пробирок Abbott *m* Sample Preparation осторожным переворачиванием.

Если после открывания пробирок с реагентами в содержимом наблюдаются кристаллы, оставьте пробирки при комнатной температуре до полного растворения кристаллов. Не используйте реагенты до тех пор, пока кристаллы не растворятся полностью.

4. Перемешайте каждый внутренний контроль на вортексе три раза в течение 2-3 секунд перед использованием.

5. Внесите 500 мкл внутреннего контроля в каждый флакон лизисного буфера *mLysis Buffer*. **ДЛЯ ВНЕСЕНИЯ ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЯ ИСПОЛЬЗУЙТЕ ТОЧНО ОТКАЛИБРОВАННЫЕ ПИПЕТКИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ТОЛЬКО НА ЭТОМ ЭТАПЕ.** Перемешайте, аккуратно переворачивая флакон 5 – 10 раз, чтобы избежать сильного вспенивания.

6. **Максимально за одну постановку можно провести 48 реакций.** В каждую постановку включаются отрицательный контроль, слабый положительный контроль и сильный положительный контроль, что снижает максимальное количество исследуемых образцов до 45 за одну постановку.

- Минимальные объемы образцов, используемые в наборе Abbott RealTime ВИЧ-1 и связанные с этим требования к размеру ячеек Abbott *m2000sp* следующие:

Размер ячейки	Диаметр пробирки*	Минимальный объем образца для анализа в наборе Abbott RealTime ВИЧ-1		
		0.2 мл	0.5 мл	1.0 мл
10 мм	10.0 мм – 11.5 мм	0.5 мл	0.8 мл	1.3 мл
13 мм	11.6 мм – 14.0 мм	0.7 мл	1.0 мл	1.5 мл
16 мм	15.0 мм – 16.0 мм	1.0 мл	1.3 мл	1.8 мл

* внешний диаметр пробирки

- Если образцы были заморожены, разморозьте их при температуре 15-30°C или при 2-8°C. Размороженные образцы можно хранить при температуре 2-8°C не более 6 часов.

- Перемешайте каждый образец на вортексе три раза в течение 2-3 секунд перед загрузкой в аппарат Abbott *m2000sp*. **Мутные образцы и образцы, в которых наблюдается наличие твердых частиц, перед исследованием необходимо отцентрифугировать при 2,000 g в течение 5 минут.** Перенести необходимое количество исследуемого образца в чистую пробирку, если это необходимо. Для информации о размере реакционных пробирок, обратитесь к инструкции по использованию прибора Abbott *m2000sp*. Не прикасайтесь к внутренней поверхности крышек при открывании пробирок.

7. Поместите калибраторы (если это необходимо), слабый и сильный положительные контроли, отрицательный контроль и исследуемые образцы в ячейки для образцов аппарата Abbott *m2000sp*.

8. Поместите 5-миллилитровые реакционные пробирки в 1-миллилитровую каретку подсистемы *m1000*.

9. Загрузите реагенты системы пробоподготовки Abbott *m* Sample Preparation System и 96-луночный планшет с глубокими лунками Abbott 96 Deep-Well Plate в аппарат Abbott *m2000sp* как описано в инструкции по использованию аппарата Abbott *m2000sp*, раздел Инструкция по работе с прибором.

10. Выберите вариант анализа, в соответствии с объемом тестируемого образца. Запустите исследовательский протокол, как описано в инструкции по использованию аппарата Abbott *m2000sp*, раздел Инструкция по работе с прибором.

- Внесите в поля **Sample Extraction: Worktable Setup, Calibrator and Control** файла постановки реакции значения лотов калибраторов (в том случае, если необходимо провести калибровку прибора) и контролей для правильной калибровки прибора и оценки результатов. Значения лотов указаны на ярлыке набора калибраторов и контролей Abbott RealTime ВИЧ-1.

- Протокол добавления смеси мастер-микс Abbott *m2000sp* Master Mix Addition protocol (пункт 12) должен быть запущен в течение одного часа после завершения процесса пробоподготовки.

ВНИМАНИЕ: Смените перчатки перед работой с реагентами для амплификации.

11. Загрузите реагенты для амплификации и пробирку для смеси мастер-микс в аппарат *m2000sp* после того, как завершен процесс пробоподготовки.

- Каждая упаковка реагентов для амплификации рассчитана на 24 реакции.
- Перед открыванием пробирок с реагентами для амплификации, убедитесь, что содержимое находится на дне пробирки, в противном

случае постучите пробиркой о стол, так, чтобы сбросить содержимое на дно.

- Снимите и утилизируйте крышки с пробирок с реагентами для амплификации.
- При проведении более 24 реакций (25-48 реакций), требуется вторая упаковка реагентов для амплификации.

12. Выберите вариант анализа, соответствующий объему тестируемого образца.

Запустите протокол добавления смеси мастер-микс Abbott *m2000sp* Master Mix Addition protocol. Следуйте инструкциям, описанным в руководстве по использованию аппарата Abbott *m2000sp*.

- Протокол *m2000rt* (пункт 16) должен быть запущен в течение 40 после запуска протокола добавления смеси мастер-микс (пункт 12).

13. Включите и запустите аппарат Abbott *m2000rt* в Области амплификации.

- **ВНИМАНИЕ:** Аппарату Abbott *m2000rt* требуется 15 минут для того, чтобы прогреться.

ВНИМАНИЕ: Смените перчатки перед возвращением в область приготовления образцов.

14. Заклейте 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate после внесения в него образцов и смеси мастер-микс в аппарате Abbott *m2000sp* в соответствии с инструкциями к прибору Abbott *m2000sp*, раздел Инструкция по работе с прибором.

15. Поместите закрытый оптический реакционный планшет в брызгогаситель Splash Free Support Base для переноса в прибор Abbott *m2000rt*.

16. Поместите 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate в аппарат Abbott *m2000rt*. Выберите вариант анализа, соответствующий объему тестируемого образца. Запустите протокол Abbott RealTime ВИЧ-1, в соответствии с инструкциями к прибору Abbott *m2000rt*, раздел Инструкция по работе с прибором.

ПРОЦЕДУРЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Удалите планшет с глубокими лунками Abbott 96 Deep-Well Plate из аппарата Abbott *m2000sp* и утилизируйте его в соответствии с инструкцией к прибору Abbott *m2000sp*.

2. Поместите 96-луночный оптический реакционный планшет Abbott 96-Well Optical Reaction Plate в пластиковый контейнер и утилизируйте в соответствии с инструкцией к прибору Abbott *m2000rt* вместе с перчатками, используемыми при данной работе.

3. Очистите брызгогаситель Splash Free Support Base перед следующим использованием в соответствии с инструкцией к прибору Abbott *m2000rt*.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Оптическая калибровка Abbott *m2000rt* Optical Calibration

Для подробного описания принципов проведения оптической калибровки аппарата Abbott *m2000rt* обратитесь к разделу Калибровка инструкции по использованию аппарата Abbott *m2000rt*.

Оптическая калибровка аппарата Abbott *m2000rt* требуется для точного измерения флуоресценции и повышения разрешающей способности во время анализа с использованием набора Abbott RealTime ВИЧ-1.

Для калибровки аппарата Abbott *m2000rt* при проведении анализа с использованием набора Abbott RealTime ВИЧ-1 используются следующие Калибровочные красители Abbott *m2000rt* Optical Calibration Plates:

- FAM™ Plate (Карбоксифлуоресцин)
- ROX™ Plate (Карбокси-X-родамин)
- VIC® Plate (Патентованный краситель Proprietary dye)

Проведение калибровки

Для подробного описания проведения оптической калибровки аппарата Abbott *m2000rt* обратитесь к разделам Инструкция по работе с прибором руководств по использованию аппаратов Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*.

Для количественной оценки концентрации РНК ВИЧ-1 в образцах и контролях необходимо построить калибровочные кривые.

Для построения калибровочной кривой (представляющей соотношение концентрации РНК ВИЧ-1 и порогового цикла [C_t], т.е. цикла, при котором начинается детекция флуоресцентного сигнала) необходимо провести анализ двух калибраторов в трех повторностях. Наклон калибровочной кривой и точка пересечения рассчитываются и сохраняются в инструменте. Концентрация РНК ВИЧ-1 в исследуемом образце рассчитывается в соответствии с сохраненной калибровочной кривой. Результаты автоматически сохраняются в рабочей станции *m2000rt*.

Для построения калибровочной кривой проводите анализ в соответствии с протоколами выделения РНК, добавления смеси мастер-микс, амплификации и детекции, описанными в руководствах по использованию приборов Abbott *m1000*, Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*.

После проведения калибровки и сохранения полученных результатов, следующая калибровка требуется только если:

- Используется новый лот набора реагентов для амплификации Abbott RealTime ВИЧ-1 Amplification Reagent Kit.
- Используется новый лот системы пробоподготовки Abbott *m* Sample Preparation System (4 x 24 Preps).
- Используется другой объем исследуемого образца.

Выявление ингибирования

Во время проведения калибровки устанавливается пороговый цикл [C_t], характеризующий правильность значений внутреннего контроля.

Постоянное, строго определенное количество ВК вносится в каждый образец, калибратор и контроль в начале процесса пробоподготовки и измеряется аппаратом Abbott *m2000rt*, свидетельствуя о правильном протекании процесса реакции и справедливости полученных результатов. ВК представляет собой последовательность РНК, неродственную последовательности ВИЧ-1.

Средние значения циклов амплификации, при которых происходит детекция флуоресцентного сигнала последовательности ВК в калибровочных образцах, ($IC\ C_t$) рассматриваются как предельные значения достоверности результатов, с которыми сравниваются результаты всех последующих постановок.

В том случае, если результаты, полученные при исследовании образца или контроля, не соответствуют указанным границам, появляется предупреждение об ошибке. Для получения информации о действиях, необходимых для коррекции такой ошибки, обратитесь к руководству по использованию прибора *m2000rt*. Образцы, значения $IC\ C_t$ которых превышают установленные границы, должны быть протестированы заново, начиная с этапа пробоподготовки.

Отрицательный и положительный контроли

Для оценки достоверности результатов при каждой постановке реакции должны использоваться отрицательный, слабый положительный и сильный положительный контроли.

Номера лотов слабого положительного контроля и сильного положительного контроля указаны на каждом ярлыке набора контролей Abbott RealTime ВИЧ-1 и должны быть внесены в файл постановки реакции (test order) перед началом анализа.

В том случае, если контрольные результаты не соответствуют предельно допустимым, появляется информация об ошибке. Для получения информации о действиях, необходимых для коррекции такой ошибки, обратитесь к руководству по использованию прибора Abbott *m2000rt*. Если результаты анализа положительных или отрицательного контролей не соответствуют предельно допустимым, все образцы и контроли из данной

постановки должны быть протестированы заново, начиная с момента пробоподготовки.

В отрицательном контроле не должно выявляться присутствие РНК ВИЧ-1. Присутствие РНК ВИЧ-1 в отрицательном контроле указывает на контаминацию другими образцами или ранее амплифицированным продуктом, произошедшую во время приготовления образцов или во время подготовки 96-луночных оптических реакционных планшетов Abbott 96-Well Optical Reaction Plate. Для того, чтобы избежать контаминации, произведите очистку приборов Abbott *m1000 System* или *m2000sp* и Abbott *m2000rt* и повторите постановку образцов и контролей, следуя указаниям раздела

Меры предосторожности.

Мониторинг лаборатории на присутствие контаминации

Рекомендуется проводить данный тест как минимум один раз в месяц для мониторинга лаборатории на присутствие контаминации продуктами амплификации. Очень важно протестировать все области и оборудование лаборатории, которые могли подвергаться воздействию исследуемых образцов, контролей, калибраторов и/или амплифицированного продукта, включая автоматические пипетки, аппараты Abbott *m1000 System*, Abbott *m2000sp* и Abbott *m2000rt*, поверхность лабораторных столов, микроцентрифуги и адаптеры к центрифугам.

1. В свободную от РНаз микроцентрифужную пробирку объемом 1.7 мл, внесите 0.8 мл воды, свободной от РНаз.
2. Смочите ватную палочку водой из микроцентрифужной пробирки.
3. Используя смоченную ватную палочку, протрите исследуемую поверхность. Затем поместите ватную палочку в микроцентрифужную пробирку.
4. Покрутите погруженную в воду ватную палочку 10 раз и, слегка отжав, извлеките ее из воды. Утилизируйте ватную палочку.
5. Внесите 0.5 мл буфера Promega Wash 1 в чистую пробирку, используя автоматическую пипетку, предназначенную для работы с внутренним контролем.
6. Внесите 20 мкл буфера Promega Wash 1 в каждую микроцентрифужную пробирку.
7. Закройте микроцентрифужную пробирку.
8. Протестируйте каждый образец в соответствии с разделом Процедура исследования данного руководства.
 - Перенесите жидкость из микроцентрифужной пробирки в реакционные пробирки, объемом 5 мл.
 - Доведите объем водой до 1.5 мл.
9. Присутствие контаминации определяется детекцией РНК ВИЧ-1 в исследуемых образцах.

10. Если обнаружено присутствие РНК ВИЧ-1 на лабораторном оборудовании, следуйте указаниям по очистке и деkontаминации, приводящимся в инструкциях по использованию данного оборудования. Если обнаружено присутствие РНК ВИЧ-1 на поверхностях лабораторных столов, промойте загрязненные участки 1.0%-ным раствором гипохлорита натрия, а затем 70%-ным этанолом или водой.

ВНИМАНИЕ: Растворы хлора могут разъедать лабораторное оборудование и металл. Не используйте большие количества таких растворов или повторяйте обработку 70%-ным этанолом или водой до тех пор, пока остаток хлора станет невидимым.

11. Повторите тестирование загрязненных областей, с пункта 1 до пункта 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Вычисление

Концентрация РНК ВИЧ-1 в образцах или контролях вычисляется на основании сохраненной калибровочной кривой. Аппарат Abbott *m2000rt* автоматически сохраняет полученные результаты на рабочей станции Abbott *m2000rt*. Результаты исследования могут быть выражены в копиях/мл, логарифмах Log[Копии/мл], Международных Единицах (МЕ)/мл или логарифмах Log[МЕ/мл]; (1 МЕ = 0.58 копий, 1 копия = 1.74 МЕ).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Объем образца	Результат	Интерпретация
1.0 мл	Не выявляется <1.60 Log[Копии/мл] ^a от 1.60 до 7.00 Log[Копии/мл] >7.00 Log[Копии/мл]	Мишень не выявляется Выявляется >ULQ ^d
0.5 мл	Не выявляется <1.88 Log[Копии/мл] ^b от 1.88 до 7.00 Log [Копии/мл] >7.00 Log[Копии/мл]	Мишень не выявляется Выявляется >ULQ
0.2 мл	Не выявляется <2.18 Log[Копии/мл] ^c от 2.18 до 7.00 Log[Копии/мл] >7.00 Log[Копии/мл]	Мишень не выявляется Выявляется >ULQ

^a – 40 Копий/мл

^b – 75 Копий/мл

^c – 150 Копий/мл

^d – ULQ = upper limit of quantitation (верхний предел подсчета)

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

• ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*.

• Для оптимального проведения данного анализа требуется соблюдение рекомендаций по сбору образцов, их обработке и хранению (смотрите раздел **СБОР ОБРАЗЦОВ, ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА К МЕСТУ ИССЛЕДОВАНИЯ** данного руководства).

• Для исследования с помощью набора Abbott RealTime ВИЧ-1 могут быть использованы образцы плазмы человека (собранные в пробирках с ACD-A или EDTA).

• Исследование с помощью тест-системы Abbott RealTime ВИЧ-1 должен проводить персонал, имеющий хороший навык работы в области молекулярной диагностики и обученный работе на приборах Abbott m1000 System, Abbott m2000sp и Abbott m2000rt.

• Процедура данного анализа с использованием рекомендованных приборов сокращает риск контаминации амплифицированным продуктом. Однако, контаминация нуклеиновыми кислотами из калибраторов, положительных контролей и клинических образцов должна контролироваться в процессе работы, для чего необходима хорошая лабораторная практика и точное следование указаниям данного руководства.

• Образцы, в которых не было выявлено присутствие вирусной РНК в ходе данного анализа, не должны рассматриваться как не содержащие РНК ВИЧ-1.

• Как в случае любого диагностического теста, результаты анализа Abbott RealTime ВИЧ-1 должны интерпретироваться в сочетании с другими клиническими и лабораторными показателями.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Характеристики анализа были определены с использованием набора RealTime ВИЧ-1 с системой пробоподготовки m2000sp sample preparation и объемом анализируемого образца 1.0 мл; тем не менее, они действительны и в других случаях.

Пределы детекции (LOD)

Предел детекции определяется как концентрация РНК ВИЧ-1, выявляемая с вероятностью 95% или выше.

Предел детекции, объем исследуемого образца 1.0 мл

Предел детекции набора Abbott RealTime ВИЧ-1 – 40 копий/мл, если используется 1.0 мл образца.

Предел детекции определялся тестированием разведений вирусного стандарта Лаборатории Гарантии Качества в Вирусологии (VQA) Группы Клинических Испытаний СПИД. Для разведения использовалась ВИЧ-1-отрицательная плазма человека. Тестирование проводилось с тремя лотами реагентов для амплификации на трех системах *m2000 Systems*.

Результаты, характеризующие аналитическую чувствительность набора RealTime ВИЧ-1, представлены в Таблице 1.

Таблица 1

Конц. (копии/мл)	Протестировано	Определено	Процент определения
100	57	57	100
75	57	57	100
60	57	57	100
50	57	57	100
40	57	57	100
30	57	55	96
20	57	50	88
10	56 ^a	38	68
5	57	30	53

^a – При исследовании одного образца были получены результаты, определенные прибором как ошибочные, которые не учитывались при последующем анализе.

Анализ полученных результатов показал, что значение концентрации РНК ВИЧ-1, определяемое с 95%-ной вероятностью, составило 25 копий/мл (95% CI 20-33).

Предел детекции, объем исследуемого образца 0.5 мл

Предел детекции набора Abbott RealTime ВИЧ-1 – 75 копий/мл, если используется 0.5 мл образца.

Предел детекции для объема 0.5 мл исследуемого образца определялся таким же образом, как и в случае 1.0 мл исследуемого образца.

Результаты, характеризующие аналитическую чувствительность набора RealTime ВИЧ-1, представлены в Таблице 2.

Таблица 2

Конц. (копии/мл)	Протестировано	Определено	Процент определения
100	57	57	100
75	57	57	100
60	57	54	95
50	56 ^a	52	93
40	57	47	82
30	57	46	81
20	57	42	74
10	57	26	46
5	57	21	37

^a – При исследовании одного образца были получены результаты, определенные прибором как ошибочные, которые не учитывались при последующем анализе.

Анализ полученных результатов показал, что значение концентрации РНК ВИЧ-1, определяемое с 95%-ной вероятностью, составило 65 копий/мл (95% CI 51-88).

Предел детекции, объем исследуемого образца 0.2 мл

Предел детекции набора Abbott RealTime ВИЧ-1 – 150 копий/мл, если используется 0.2 мл образца.

Предел детекции для объема 0.2 мл исследуемого образца определялся таким же образом, как и в случае 1.0 мл исследуемого образца.

Результаты, характеризующие аналитическую чувствительность набора RealTime ВИЧ-1, представлены в Таблице 3.

Таблица 3

Конц. (копии/мл)	Протестировано	Определено	Процент определения
250	57	57	100
200	57	56	98
150	57	56	98
100	57	54	95
75	57	47	82
60	57	38	67
50	57	39	68
40	54 ^a	30	56
30	52 ^a	19	37

^a – При исследовании восьми образцов были получены результаты, определенные прибором как ошибочные, которые не учитывались при последующем анализе.

Анализ полученных результатов показал, что значение концентрации РНК ВИЧ-1, определяемое с 95%-ной вероятностью, составило 119 копий/мл (95% CI 102-150).

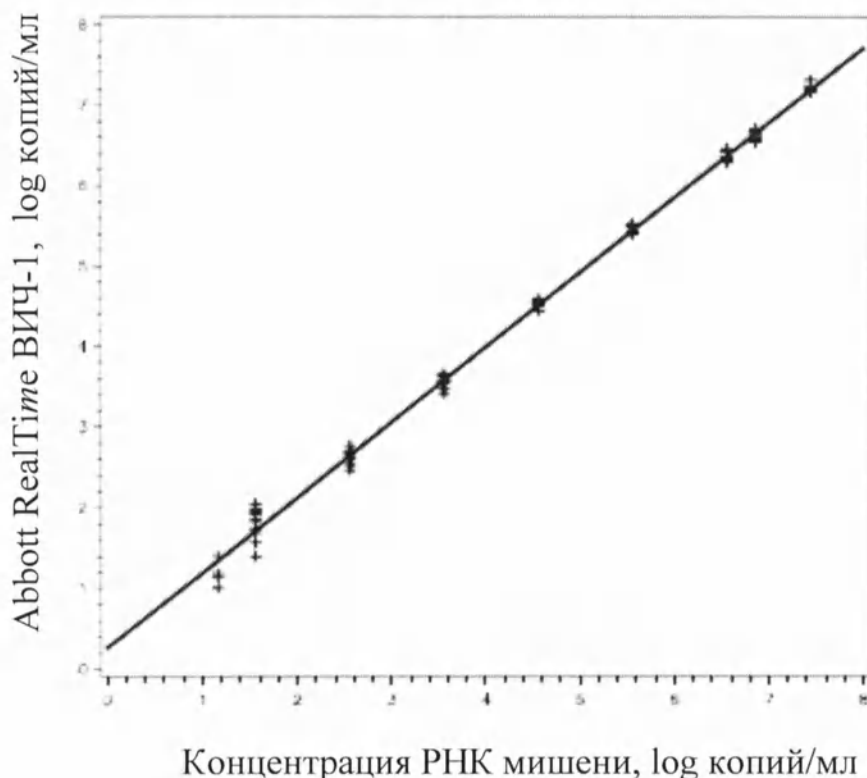
Аналитическая чувствительность метода

Верхний предел значений концентрации РНК ВИЧ-1, определяемый набором Abbott RealTime ВИЧ-1, составляет 10 миллионов копий/мл, нижний предел значений концентрации РНК ВИЧ-1 эквивалентен пределам детекции (40 копий/мл при использовании 1.0 мл образца, 75 копий/мл при использовании 0.5 мл образца и 150 копий/мл при использовании 0.2 мл образца).

Была протестирована панель из девяти образцов, полученных разведением armored РНК ВИЧ-1 отрицательной плазмой человека. Конечная концентрация РНК ВИЧ-1 в образцах составляла от 7.44 log копий/мл до 1.16 log копий/мл.

Линейный анализ был проведен в соответствии с руководством NCCLS EP6-A³⁸. Результаты линейного анализа данных, полученных с помощью набора RealTime ВИЧ-1, представлены на Рисунке 1.

Рисунок 1



Показано, что данные, полученные с помощью набора RealTime ВИЧ-1, соответствуют линейному распределению ($n=99$, $r=0.999$, наклон = 0.93, и точка пересечения = 0.26).

Точность

Точность анализа с применением набора Abbott RealTime ВИЧ-1 оценивалась для 1.0 мл исследуемого образца, анализ проводился с использованием систем пробоподготовки Abbott *m1000* и Abbott *m2000sp*. Стандартное отклонение (SD) результатов, полученных с применением набора RealTime ВИЧ-1, меньше или равняется 0.25 log копий РНК ВИЧ-1 на мл для образцов, концентрация РНК в которых составляет от 500 до 5 миллионов копий/мл.

Для проведения тестирования была приготовлена панель из семи образцов, путем разведения стоковой (с 1 по 3 образец) и armored (с 4 по 7 образец) РНК ВИЧ-1 отрицательной плазмой человека. Образцы панели были протестированы в пяти повторностях, в 15 постановках на трех приборах, с тремя лотами реагентов для амплификации. Анализ точности полученных результатов был проведен в соответствии с руководством NCCLS EP10-A2³⁹. Стандартное отклонение определялось для результатов, полученных при каждой постановке, результатов разных постановок и результатов разных тест-систем (внутри постановки и между разными постановками) Результаты, характеризующие точность анализа с использованием набора RealTime ВИЧ-1, представлены в Таблицах 4 и 5.

Таблица 4

Точность анализа с использованием системы *m1000* System

Образец панели	n	Конц. (копии/мл)	Конц. (log копии/мл)	D внутри постановки	SD разных постановок	SD разных тест-систем ^a
1	75	57	1.75	0.21	0.00	0.21
2	75	573	2.76	0.08	0.00	0.08
3	75	5,000	3.70	0.05	0.02	0.06
4	73 ^{b,c}	35,751	4.55	0.03	0.01	0.04
5	75	315,065	5.50	0.07	0.03	0.07
6	74 ^b	2,947,538	6.47	0.05	0.04	0.07
7	75	5,347,285	6.73	0.04	0.05	0.07

^a – Результаты разных тест-систем оценивались как внутри каждой постановки, так и между постановками.

^b – Два образца были ингибированы и исключены из анализа.

^c – В одном образце присутствие РНК ВИЧ-1 не было определено.

Таблица 5

Точность анализа с использованием системы *m2000 System*

Образец панели	n	Конц. (копии/мл)	Конц. (log копии/мл)	SD внутри постановки	SD разных постановок	SD разных тест-систем ^a
1	74 ^b	72	1.86	0.18	0.07	0.19
2	75	652	2.81	0.08	0.00	0.08
3	75	5,417	3.73	0.04	0.02	0.05
4	75	39,458	4.60	0.04	0.03	0.05
5	74 ^c	358,587	5.55	0.03	0.03	0.04
6	75	3,102,654	6.49	0.03	0.02	0.04
7	75	5,953,879	6.77	0.04	0.04	0.05

^a – Результаты разных тест-систем оценивались как внутри каждой постановки, так и между постановками.

^b – В одном образце присутствие РНК ВИЧ-1 не было определено.

^c – Один образец был ингибирован и исключен из анализа.

Потенциально интерферирующие вещества

Чувствительность набора Abbott RealTime ВИЧ-1 к интерференции возрастает с увеличением количества интерферирующих эндогенных веществ и лекарственных препаратов, наиболее часто назначаемых ВИЧ-1 инфицированным пациентам. Были протестированы отрицательные образцы и образцы, содержащие 10,000 копий/мл РНК ВИЧ-1.

При исследовании с использованием набора Abbott RealTime ВИЧ-1 всех положительных и отрицательных образцов интерференция не наблюдалась в присутствии следующих веществ в следующих концентрациях:

Гемоглобин	500 мг/дл
Триглицериды	3000 мг/дл
Билирубин	20 мг/дл
Белок	9 г/дл

Лекарственные препараты, в концентрациях, превышающих максимальные уровни плазмы или сыворотки, были протестированы в пяти пулах. При исследовании с использованием набора Abbott RealTime ВИЧ-1 всех положительных и отрицательных образцов интерференция не наблюдалась в присутствии следующих пулов лекарственных препаратов:

Пул	Протестированные лекарства
1	Зидовудин (Zidovudine), Саквинавир (Saquinavir), Ритонавир (Ritonavir), Кларитромицин (Clarithromycin), Интерферон 2a (Interferon 2a), Интерферон (Interferon 2b)
2	Абакавир (Abacavir), Ампренавир (Amprenavir), Регинтерферон 2a (Peginterferon 2a), Рибавирин (Ribavirin), Регинтерферон 2b (Peginterferon 2b)
3	Тенофовир диспороксил фумарат (Tenofovir disporoxil fumarate), Ламивудин (Lamivudine), Ганцикловир (Ganciclovir), Индинавир сульфат (Indinavir sulfate), Ацикловир (Acyclovir), Валганцикловир гидрохлорид (Valganciclovir hydrochloride)
4	Ставудин (Stavudine), Эвиренц (Eavirenz), Лопинавир (Lopinavir), Энфувиртид (Enfuvirtide), Ципрофлоксацин (Ciprofloxacin)
5	Зальцитабин (Zalcitabine), Невирапин (Nevirapine), Нелфинавир (Nelfinavir), Азитромицин (Azithromycin), Валацикловир (Valacyclovir)

Специфичность

Специфичность анализа с использованием набора RealTime ВИЧ-1 более 99.5%.

Специфичность анализа с использованием набора RealTime ВИЧ-1 определялась по результатам тестирования 189 клинических образцов, серонегативных по ВИЧ-1. Образцы тестировались на трех аппаратах *m2000* с тремя лотами реагентов для амплификации. В 100% случаев не обнаружено РНК ВИЧ-1 (189/189; 95% CI 98.07 - 100.00).

Далее, специфичность анализа определялась по результатам тестирования 70 образцов, полученных от пациентов, у которых наблюдались нарушения иммунитета или присутствовали следующие серологические маркеры: систематическая эритематозная волчанка (systemic lupus erythematosus (SLE), анти-ядерные антитела (ANA), ревматоидный фактор (RF), HBsAg, анти-HTLV-I/II, анти-ВГС и анти-ВИЧ-2. Ни в одном из этих образцов не было обнаружено РНК ВИЧ-1. Полученные данные свидетельствуют о том, что на результаты набора Abbott RealTime ВИЧ-1 не влияют нарушения иммунитета, серологические маркеры аутоиммунных заболеваний и другие (не ВИЧ-1) вирусные патогены.

Перекрестная реактивность

Перекрестная реактивность в исследовании с помощью набора RealTime ВИЧ-1 определялась в отношении вирусов и микроорганизмов, перечисленных ниже. Очищенные нуклеиновые кислоты или вирусные лизаты каждого микроорганизма были добавлены в отрицательные образцы плазмы и образцы, содержащие 10,000 копий/мл РНК ВИЧ-1.

Вирус Иммунодефицита человека 2	Вирус Vaccinia
Вирус Т-лимфоцитов человека 1	Полиомавирус человека ВК
Вирус гепатита С	Вирус папилломы человека 16
Вирус гепатита В	Вирус папилломы человека 18
Вирус Эпштейна-Барра	Neisseria gonorrhoeae
Вирус простого герпеса 1	Chlamydia trachomatis
Вирус простого герпеса 2	Candida albicans
Цитомегаловирус	Staphylococcus aureus
Вирус герпеса человека 6В	Staphylococcus epidermidis
Вирус герпеса человека 8	Mycobacterium gordonae
Вирус Варицелла-Зостер	Mycobacterium smegmatis

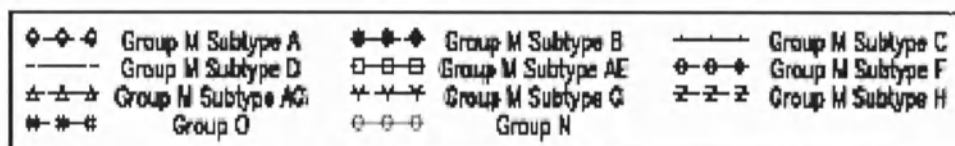
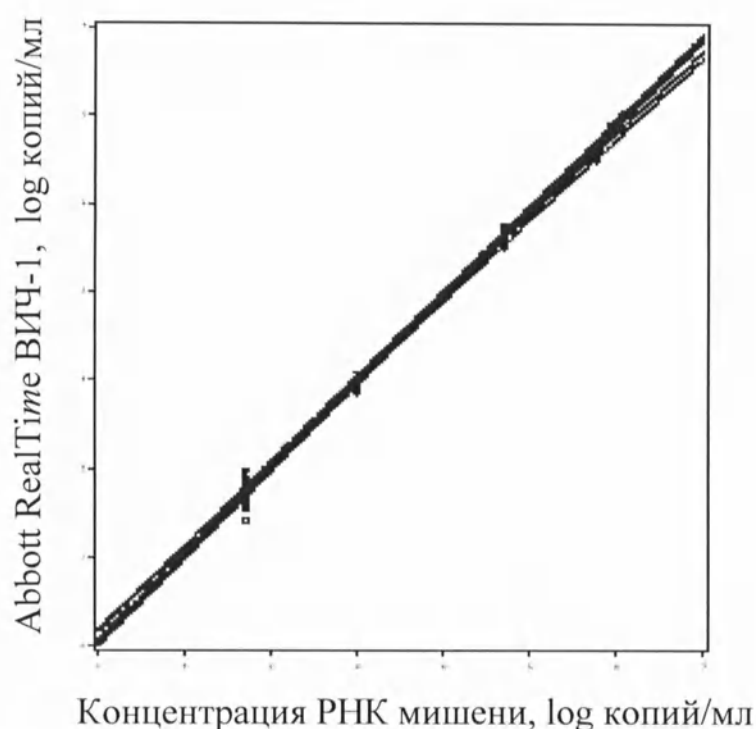
Во всех положительных и отрицательных образцах при проведении исследования с использованием набора Abbott RealTime ВИЧ-1 не наблюдалось интерференции в присутствии указанных вирусов и микроорганизмов.

Детекция субтипов и групп ВИЧ-1

Возможность применения набора Abbott RealTime ВИЧ-1 к разным субтипам/группам ВИЧ-1 оценивалась по результатам исследования очищенных транскриптов РНК из группы М (субтипы А, В, С, D, CRF01-AE, F, CRF02-AG, G и H), группы О и группы N, а также при тестировании десяти клинических образцов каждого субтипа группы М (А, В, С, D, CRF01-AE, F, CRF02-AG, G) и восьми образцов из группы О.

Были протестированы транскрипты РНК группы М (субтипы А, В, С, D, CRF01-AE, F, CRF02-AG, G и H), группы О и группы N в концентрациях приблизительно 6.0 log копии/мл, 4.7 log копии/мл, 3.0 log копии/мл и 1.7 log копии/мл. В каждой концентрации каждый транскрипт тестировался три раза. Результаты, показывающие линейное разведение для 11 субтипов/групп, представлены на Рисунке 2.

Рисунок 2



В ходе анализа были определены все исследуемые субтипы и группы, для всех протестированных групп и субтипов было показано линейное разведение (коэффициент корреляции варьировал от 0.997 до 1.000).

88 клинических образцов, по десять каждого субтипа группы М (А, В, С, D, CRF01-AE, F, CRF02-AG, G) и восемь группы О, были протестированы с использованием набора Rea lTime ВИЧ-1 и с использованием двух других тест-систем для количественного определения РНК ВИЧ-1, названных Компаратор 1 и Компаратор 2. Полученные результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6

Группа/ Субтипы	n	Определено RealTime*	Определено Компаратор 1*	Определено Компаратор 2*
М/Субтип А	10	10	10 (1)	10 (2)
М/Субтип В	10	10	10 (0)	10 (0)
М/Субтип С	10	10	10 (0)	10 (0)
М/Субтип D	10	10	10 (0)	10 (0)
М/Субтип АЕ	10	10	10 (0)	10 (0)
М/Субтип F	10	10	10 (0)	10 (0)
М/Субтип AG	10	10	10 (4)	10 (4)
М/Субтип G	10	10	10 (2)	10 (2)
Group O	8	8	0 (NA)	5 (5)

* – Цифра в скобках обозначает число образцов, значение количества РНК в которых было более чем на 1.00 log копии/мл ниже соответствующих значений, полученных на наборе Abbott RealTime ВИЧ-1.

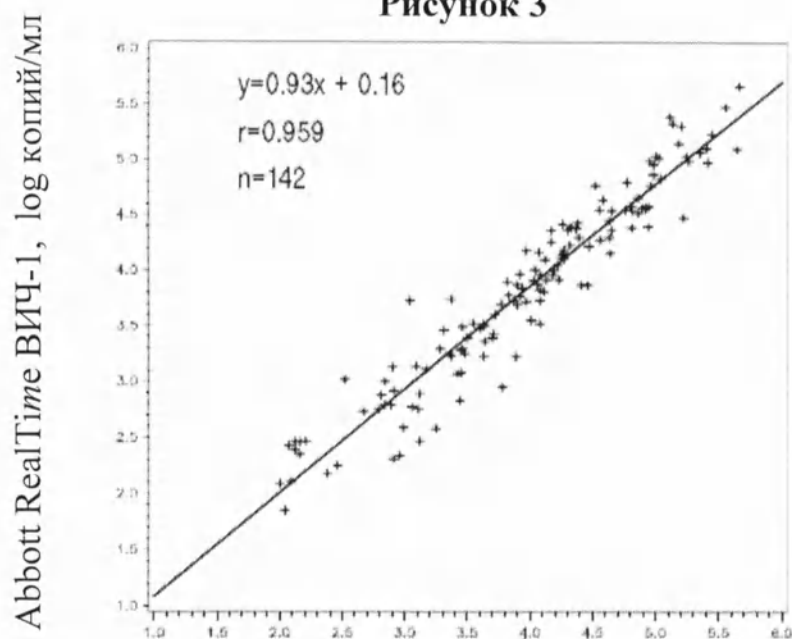
- В анализе с использованием набора Abbott RealTime ВИЧ-1 были определены все тестируемые субтипы и группы.
- В анализе с использованием компаратора 1 были определены все субтипы группы М и не определены восемь образцов группы О.
- В анализе с использованием компаратора 2 были определены все субтипы группы М и пять из восьми образцов группы О.
- Образцов, количество РНК, определенное на наборе Abbott RealTime ВИЧ-1, в которых оказалось ниже более чем на 1.00 log копии/мл соответствующих значений, полученных на Компараторе 1 или Компараторе 2, выявлено не было.
- Было выявлено семь образцов группы М, значение количества РНК, определенное на Компараторе 1, в которых было ниже более чем на 1.00 log копии/мл, по сравнению с соответствующими значениями, полученными на наборе Abbott RealTime ВИЧ-1.
- Было выявлено восемь образцов группы М, значение количества РНК, определенное на Компараторе 2, в которых было ниже более чем на 1.00 log копии/мл, по сравнению с соответствующими значениями, полученными на наборе Abbott RealTime ВИЧ-1.

Корреляция

Сравнительный анализ проводился в соответствии с NCCLS EP9-A2⁴⁰.

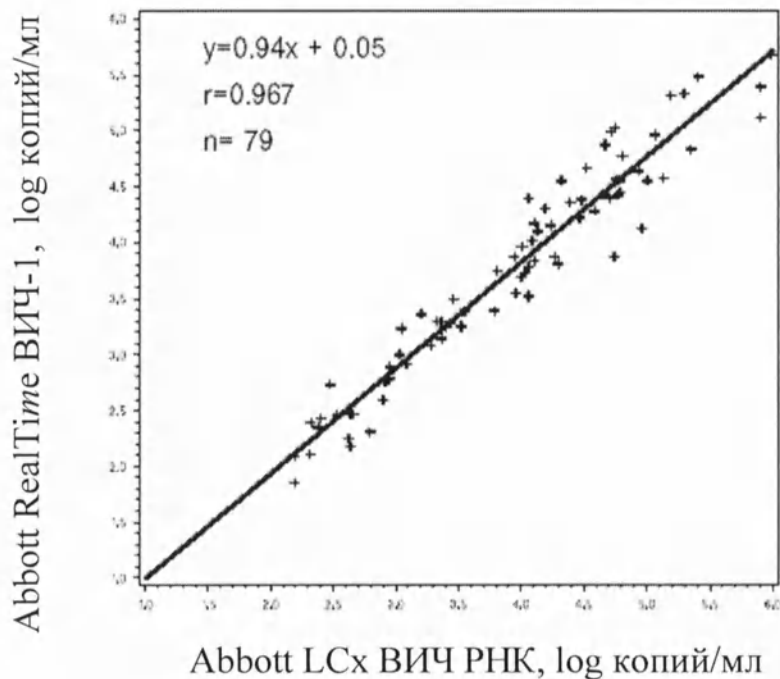
Клинические образцы от 142 ВИЧ-1 инфицированных пациентов были протестированы с использованием набора Abbott RealTime ВИЧ-1 и компараторной методики. Схема корреляции представлена на Рисунке 3.

Рисунок 3



Клинические образцы от 79 ВИЧ-1 инфицированных пациентов (часть 142 протестированных ранее образцов) были исследованы с использованием количественного анализа Abbott LCx ВИЧ РНК. Схема корреляции представлена на Рисунке 4.

Рисунок 4



Bibliography

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:868-71.
2. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, et al. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984;224:497-500.
3. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984;224:500-3.
4. Curran JW, Jaffe HW, Hardy AM, et al. Epidemiology of HIV infection and AIDS in the United States. *Science* 1988;239:610-16.
5. Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *New Engl J Med* 1991;324:961-4.
6. Clark SJ, Saag MS, Decker WD. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *New Engl J Med* 1991;324:954-60.
7. Albert J, Abrahamsson B, Nagy K, et al. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* 1990;4:107-12.
8. Horsburgh CR Jr, Ou CY, Jason J, et al. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* 1989;334:637-40.
9. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *New Engl J Med* 1993;328:327-35.
10. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995;373:123-6.
11. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995;373:117-22.
12. Mellors JW, Rinaldo CR JR, Gupta P, et al. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996;272:1167-70.
13. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997;126(12):946-54.
14. Chene G, Sterne JA, May M, et al. Prognostic importance of initial response in HIV-1 infected patients starting potent antiretroviral therapy: analysis of prospective studies. *Lancet* 2003;362:679-86.
15. Egger M, May M, Chene G, et al. Prognosis of HIV-1 infected drug patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet* 2002;360:119-29.
16. Wood E, Hogg RS, Yip B, et al. Higher baseline levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA are associated with increased mortality after initiation of triple-drug antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2003;188:1421-5.

17. US Department of Health and Human Services. 2004 guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents. Available at: <http://AIDSinfo.nih.gov/guidelines>.
18. Yeni PG, Hammer SM, Hirsch MS, et al. Treatment for Adult HIV Infection. 2004 Recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 2004;292:251-65.
19. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, et al. Decay characteristics of HIV-1 infected compartments during combination therapy. *Nature* 1997;387(6629):188-91.
20. Mulder J, McKinney N, Christopher C, et al. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *J Clin Microbiol* 1994;32:292-300.
21. Dewar RL, Highbarger HC, Sarmiento MD, et al. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *J Inf Diseases* 1994;170:1172-9.
22. Van Gemen B, Kievits T, Schukkink R, et al. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA™ during HIV-1 primary infection. *J Virol Methods* 1993;43:177-87.
23. Yen-Lieberman B, Brambilla D, Jackson B, et al. Evaluation of a quality assurance program for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma by the AIDS clinical trials group virology laboratories. *J Clin Microbiol* 1996;34:2695-701.
24. Holmes H, Davis C, Heath A, et al. An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid-based techniques. *J Virol Methods* 2001;92:141-50.
25. Davis C, Heath A, Best S, et al. Calibration of HIV-1 working reagents for nucleic acid amplification techniques against the 1st international standard for HIV-1 RNA. *J Virol Meth* 2003;107:37-44.
26. Myers TW, Gelfand DH. Reverse Transcription and DNA Amplification by a *Thermus thermophilus* DNA Polymerase. *Biochem* 1991;30:7661-6.
27. Myers G, Korber B, Wain-Hobson S, et al. Human retroviruses and AIDS 1994: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics (T10). Los Alamos, New Mexico:1994.
28. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens.
29. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fourth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, May 1999.
30. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual - Third Edition*. Geneva: World Health Organization; 2004.
31. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline - Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: CLSI, 2005.

32. CDC. Guidelines for the prevention of human immunodeficiency virus and hepatitis B virus to health-care and public-safety workers. *MMWR* 1989;38(S-6):16S.
33. Schulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, et al. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Envir Microbiol* 1981;42(5):762-7.
34. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline - Second Edition*. NCCLS Document GP5-A2. Wayne, PA: NCCLS, 2002;22(3):1-23, 32-44.
35. US Environmental Protection Agency. *EPA Guide for Infectious Waste Management Publication* No. EPA/530-SW-86-014. Washington, DC: US Environmental Protection Agency, 1986:1-1-5-5, R1-R3, A1-A24.
36. Ginocchio C, Wang X, Kaplan M, et al. Effects of specimen collection, processing, and storage conditions on stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma. *J Clin Microbiol* 1997;35(11):2886-93.
37. Sebire K, McGavin K, Land S, et al. Stability of human immunodeficiency virus RNA in blood specimens as measured by a commercial PCR-based assay. *J Clin Microbiol* 1998;36(2):493-8.
38. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline - NCCLS document EP6-A*, NCCLS: Wayne, PA, 2002.
39. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Methods; Approved Guideline - Second Edition*. NCCLS Document EP10-A2. NCCLS: Wayne, PA, 2002.
40. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline-Second Edition* NCCLS document EP9-A2, NCCLS Wayne, PA, 2002.

ПРИОБРЕТЕНИЕ ДАННОГО ПРОДУКТА ПОЗВОЛЯЕТ ПОКУПАТЕЛЮ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ЕГО ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO. ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДАННОГО ПРОДУКТА НЕ ТРЕБУЕТСЯ НИКАКИХ ДРУГИХ ПАТЕНТОВ ИЛИ ЛИЦЕНЗИЙ. ДАННОЕ УСЛОВИЕ НЕ ПРЕПЯТСТВУЕТ ПЕРЕПРОДАЖЕ ЭТОГО ПРОДУКТА.

Armored RNA® - это запатентованная технология, разработанная совместно Ambion, Inc. и Cenetron Diagnostics, LLC. U.S. патенты #5,677,124, #5,919,625, #5,939,262 и незавершенные патенты.

Armored RNA является зарегистрированной торговой маркой Ambion.

ProClin является зарегистрированной торговой маркой Rohm and Haas.

StrataCooler является зарегистрированной торговой маркой Stratagene.

FAM и ROX являются торговыми марками Applied Biosystems Corporation или ее подразделений в США и/или других странах.

VIC является зарегистрированной торговой маркой Applied Biosystems Corporation или ее подразделений в США и/или других странах.

RealTime, m1000, m2000, m2000rt, and m2000sp являются торговыми марками Abbott Laboratories.

Abbott Laboratories является официальным производителем:

Набора реагентов для амплификации Abbott RealTime HIV-1 Amplification Reagent Kit (List No. 2G31-90);

Набора контролей Abbott RealTime HIV-1 Control Kit (List No. 2G31-80);

Набора калибраторов Abbott RealTime HIV-1 Calibrator Kit (List No. 2G31-70).

Abbott Laboratories

Abbott Park, IL 60064 USA

