

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор

АО "ЭКОлаб"



Т.Ю. Гашенко

2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

медицинского изделия для диагностики *in vitro*

**«Набор реагентов для выделения и качественного определения РНК
вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ1) в клиническом материале методом
ПЦР в режиме реального времени
«ВИЧ1 ЭК РНК ЭКС» по ТУ 20.59.52-370-70423725-2024»**

НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для выделения и качественного определения РНК вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ1) в клиническом материале методом ПЦР в режиме реального времени «ВИЧ1 ЭК РНК ЭКС» по ТУ 20.59.52-370-70423725-2024» (далее по тексту - «набор реагентов «ВИЧ1 ЭК РНК ЭКС» или «набор реагентов») предназначен для выделения и качественного определения РНК ВИЧ1 в образцах плазмы (с КЭДТА) и сыворотке крови человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Материалом для проведения ОТ-ПЦР/ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Функциональное назначение набора реагентов «ВИЧ1 ЭК РНК ЭКС» - диагностика инфекции, вызванной ВИЧ1.

Набор предназначен для обследования всех групп населения любого возраста без градации по демографическому или популяционному признаку.

Полученные результаты анализа свидетельствуют о наличии/отсутствии РНК вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ1) в пробах клинического материала.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики *in vitro*.

Потенциальные потребители изделия

Набор реагентов предназначен только для профессионального использования в медицинских и научно-исследовательских учреждениях, работа лабораторий которых организована в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Для работы с набором реагентов сотрудники лаборатории должны иметь среднее или высшее образование (медицинское, или биологическое, или ветеринарное), прошедшие подготовку на лицензированных курсах по работе с микроорганизмами II группы патогенности и курсах повышения квалификации по молекулярно-биологической диагностике.

Показания к применению изделия

Применение набора реагентов «ВИЧ1 ЭК РНК ЭКС» показано для оценки наличия или отсутствия РНК ВИЧ1 в исследуемом образце РНК вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ1) (вирусной нагрузки).

Выявление РНК ВИЧ1:

- скрининг донорской крови (в СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных заболеваний», раздел IV «Профилактика ВИЧ-инфекции», п. 618);

- выявление ВИЧ-инфекции в период серологического окна;

- для подтверждения положительных результатов, полученных методами ИФА и ИХЛА (СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных заболеваний», раздел IV «Профилактика ВИЧ-инфекции», п. 619).

РНК ВИЧ1 может быть обнаружена на 7-10 день после заражения.

При возможности заражения ребенка от матери в период беременности или родов исследование проводится в первые 48 часов жизни ребенка и повторно на 6-8-й неделе жизни ребенка независимо от результата первого исследования. Окончательный вывод о ВИЧ1-статусе можно сделать не позднее 6 месяца жизни ребенка. Не рекомендуется использовать выявление РНК ВИЧ1, поскольку профилактическая антиретровирусная терапия беременной и новорожденного, может существенно снизить репликацию вируса, что приведет к снижению концентрации РНК ВИЧ1 и повысит вероятность получения ложноотрицательного результата при обследовании ребенка.

Противопоказания

Противопоказаниями к использованию набора реагентов являются:

- истекший срок годности набора реагентов,
- нарушение внутренней упаковки компонентов набора,
- несоответствие внешнего вида компонентов их описанию в инструкции,
- ненадлежащие условия хранения и /или транспортирования.

Другие противопоказания, при использовании набора реагентов специально обученным персоналом в строгом соответствии с требованиями инструкции по применению, отсутствуют.

Возможные побочные действия

При использовании медицинского изделия по инструкции по применению побочные действия не выявлены.

ОПИСАНИЕ ЦЕЛЕВОГО АНАЛИТА, СВЕДЕНИЯ О ЕГО НАУЧНОЙ ОБОСНОВАННОСТИ

ВИЧ1 – это возбудитель хронической системной вирусной инфекции (ВИЧ1-инфекции). Его относят к семейству ретровирусов (Retroviridae). Вирусная частица представляет собой РНК, упакованную в белковую капсулу (капсид вируса), которая в свою очередь покрыта вирусной оболочкой (суперкапсидом). На сегодняшний день известны два типа вируса – ВИЧ1 и ВИЧ2.

ВИЧ2 распространен преимущественно в западноафриканских странах.

ВИЧ1-инфекция – хронический, медленно прогрессирующий патологический процесс, при котором происходит поражение иммунной системы с развитием синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИДа). СПИД – это терминальная стадия развития ВИЧ1-инфекции, которая сопровождается широким спектром вторичных (оппортунистических) заболеваний. При СПИДе оппортунистические инфекции поражают все органы и системы ВИЧ1-инфицированных.

После заражения вирус проникает в клетки, на поверхности которых представлен рецептор CD4 (кластер дифференцировки 4) – трансмембранная гликопротеиновая молекула. Такой рецептор есть только у одного типа клеток – Т-хелперов. Это популяция белых клеток крови (Т-лимфоцитов), которая играет ключевую роль в поддержании необходимого уровня адаптивного иммунного ответа, то есть реакции организма на чужеродные агенты. Поражение Т-хелперов приводит к нарушению функции иммунной системы у ВИЧ1-инфицированных.

Вакцины, предотвращающей развитие ВИЧ1-инфекции, не существует. Однако разработаны препараты для антиретровирусной терапии, которая позволяет остановить развитие ВИЧ1-инфекции и предотвратить возникновение СПИДа.

ВИЧ1-инфекция может передаваться половым путем, через контаминированную кровь и ее продукты, или от инфицированной матери плоду. Через 3 – 6 недель после инфицирования обычно развивается недлительный острый синдром, для которого характерны гриппоподобные симптомы и высокие уровни вирусемии. В большинстве случаев после этого развивается ВИЧ1-специфичный иммунный ответ и снижение вирусемии, обычно через 4 – 6 недель после появления симптомов. После сероконверсии наступает клинически стабильная бессимптомная фаза, способная длиться годами. Для бессимптомного периода характерен невысокий уровень персистирующей вирусемии и постепенное снижение уровней CD4+ Т-лимфоцитов, которое, как уже говорилось, приводит к развитию тяжелого иммунодефицита, множественным оппортунистическим инфекциям, онкогенезу и смерти ВИЧ-1-инфицированного.

СОСТАВ НАБОРА

Набор реагентов «ВИЧ1 ЭК РНК ЭКС» выпускается в пяти формах и двух комплектах.

Комплект № 1

Наименование компонента	Характеристика компонента	Количество компонента				
		Форма 1	Форма 2	Форма 3	Форма 4	Форма 5
Внешний вид компонентов для амплификации						
Планшет-96 ВИЧ1 РНК/ЛИО (Планшет нестерильный для ПЦР-диагностики по ТУ 32.50.50-011-48072026-2022:планшет для ПЦР на 96 лунок «Каракатица», профиль стандартный; РУ № РЗН 2023/19821)	Планшет на 96-лунок «Каракатица», профиль стандартный с лиофилизированной смесью белого или серого цвета	-	1 шт. (лиофилизат из 0,05 мл в каждой лунке)	-	-	-
Изделие для запечатывания планшетов по ТУ 32.50.50-009-48072026-2022: пленка для ПЦР планшетов газопроницаемая; РУ № РЗН 2022/19122	Пленка с полиакрилатным клеевым слоем и подложки из силиконизированной бумаги	-	1 шт.	-	-	-
Стрип ВИЧ1 РНК /ЛИО (Пробирка нестерильная для лабораторных работ по ТУ 32.50.50-012-48072026-2022: пробирка 0,2 мл. в стрипах, стандартный	Пробирки 0,2 мл. в стрипах, бесцветные; с реакционной лиофилизированной смесью белого или серого цвета	-	-	-		12x8 шт. (лиофилизат из 0,05 мл в каждой лунке)

профиль, 1x8, с прикрепленными крышками; РУ № РЗН 2023/20736)						
Стрип ВИЧ1 РНК /под воском (Пробирка нестерильная для лабораторных работ по ТУ 32.50.50-012- 48072026-2022: пробирка 0,2 мл. в стрипах, стандартный профиль, 1x8, с прикрепленными крышками; РУ № РЗН 2023/20736)	Пробирки 0,2 мл в стрипах, бесцветные, с реакционной смесью под воском твердой белой субстанции	-	-	-	12x8 шт. (по 0,05 мл)	-
Пробирки ВИЧ1 РНК/ ЛЮО (Пробирка нестерильная для лабораторных работ по ТУ 32.50.50-012- 48072026-2022: пробирка 0,2 мл, с крышкой; РУ № РЗН 2023/20736)	Пробирки для ПЦР 0,2 мл, бесцветные с реакционной лиофилизированной смесью белого или серого цвета	96 пробирок (лиофили зат из 0,05 мл)	-	-	-	-
Пробирки ВИЧ1 РНК /под воском (Пробирка нестерильная для лабораторных работ по ТУ 32.50.50-012- 48072026-2022: пробирка 0,2 мл, с крышкой; РУ № РЗН 2023/20736)	Пробирки для ПЦР 0,2 мл; бесцветные , с реакционной смесью под воском твердой белой субстанции	-	-	96 пробирок (по 0,05 мл)	-	-
Разбавитель	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 пробирка (1,5 мл)	1 пробирка (1,5 мл)	-	-	1 пробирка (1,5 мл)
Положительный контрольный образец (ПКО- ВИЧ1-РНК)	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	-	-	1 пробирка (0,2 мл)	1 пробирка (0,2 мл)	
Положительный контрольный образец (ПКО-	Лиофилизированная смесь белого или серого цвета	1 пробирка (лиофили	1 пробирка (лиофилизат	-	-	1 пробирка (лиофилизат



ВИЧ1-РНК-ЛИО)		зат из 0,5 мл)	из 0,5 мл)			из 0,5 мл)
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 пробирка а (1,5 мл)	1 пробирка (1,5 мл)	1 пробирка (0,2 мл)	1 пробирка (0,2 мл)	1 пробирка (1,5 мл)
Внешний вид компонентов для экстракции						
Лизирующий раствор	Прозрачная жидкость от бесцветного до жёлтого цвета (может кристаллизироваться)	1 флакон (60,0 мл)	1 флакон (60,0 мл)	1 флакон (60,0 мл)	1 флакон (60,0 мл)	1 флакон (60,0 мл)
Сорбент	Суспензия магнитных частиц коричневого цвета	1 пробирка (1,0 мл)	1 пробирка (1,0 мл)	1 пробирка (1,0 мл)	1 пробирка (1,0 мл)	1 пробирка (1,0 мл)
Раствор 1	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 флакон (60,0 мл)	1 флакон (60,0 мл)	1 флакон (60,0 мл)	1 флакон (60,0 мл)	1 флакон (60,0 мл)
Раствор 2	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	2 флакона (по 60,0 мл)	2 флакона (по 60,0 мл)	2 флакона (по 60,0 мл)	2 флакона (по 60,0 мл)	2 флакона (по 60,0 мл)
Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 флакон (30,0 мл)	1 флакон (30,0 мл)	1 флакон (30,0 мл)	1 флакон (30,0 мл)	1 флакон (30,0 мл)
Отрицательный контроль экстракции (ОКЭ)	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 флакон (10,0 мл)	1 флакон (10,0 мл)	1 флакон (10,0 мл)	1 флакон (10,0 мл)	1 флакон (10,0 мл)
Концентрирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 флакон (100,0 мл)	1 флакон (100,0 мл)	1 флакон (100,0 мл)	1 флакон (100,0 мл)	1 флакон (100,0 мл)
Инструкция по применению		1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.

Комплект № 2

Наименование компонента	Характеристика компонента	Количество компонента				
		Форма 1	Форма 2	Форма 3	Форма 4	Форма 5
Внешний вид компонентов для амплификации						
Планшет-48 ВИЧ1 РНК /ЛИО (Планшет нестерильный для ПЦР-диагностики по ТУ 32.50.50-011-48072026-2022: планшет для ПЦР на 48 лунок без юбки, профиль стандартный; РУ № РЗН 2023/19821)	Планшет на 48-лунок без юбки, профиль стандартный, с лиофилизированной смесью белого или серого цвета	-	1 шт. (лиофилизат из 0,05 мл в каждой лунке)	-	-	-
Изделие для запечатывания	Пленка с полиакрилатным	-	1 шт.	-	-	-

Введена впервые

планшетов по ТУ 32.50.50-009-48072026-2022: пленка для ПЦР планшетов газопроницаемая; РУ № РЗН 2022/19122	клеевым слоем и подложки из силиконизированной бумаги					
Стрип ВИЧ1 РНК /ЛИО (Пробирка нестерильная для лабораторных работ по ТУ 32.50.50-012-48072026-2022: пробирка 0,2 мл. в стрипах, стандартный профиль, 1х8, с прикрепленными крышками; РУ № РЗН 2023/20736)	Пробирки 0,2 мл. в стрипах, бесцветные; с реакционной лиофилизированной смесью белого или серого цвета	-	-	-		6х8 шт. (лиофилизат из 0,05 мл в каждой лунке)
Стрип ВИЧ1 РНК /под воском (Пробирка нестерильная для лабораторных работ по ТУ 32.50.50-012-48072026-2022: пробирка 0,2 мл. в стрипах, стандартный профиль, 1х8, с прикрепленными крышками; РУ № РЗН 2023/20736)	Пробирки 0,2 мл в стрипах, бесцветные, с реакционной смесью под воском, твердой белой субстанции	-	-	-	6х8 шт. (по 0,05 мл)	-
Пробирки ВИЧ1 РНК/ ЛИО (Пробирка нестерильная для лабораторных работ по ТУ 32.50.50-012-48072026-2022: пробирка 0,2 мл, с крышкой; РУ № РЗН 2023/20736)	Пробирки для ПЦР 0,2 мл, оптически прозрачные с реакционной лиофилизированной смесью белого или серого цвета	48 пробирок (лиофилизат из 0,05 мл)	-	-	-	-
Пробирки ВИЧ1 РНК /под воском (Пробирка нестерильная для лабораторных работ по ТУ 32.50.50-012-48072026-2022:	Пробирки для ПЦР 0,2 мл; оптически прозрачные с реакционной смесью под воском, твердой	-	-	48 пробирок (по 0,05 мл)	-	-

пробирки 0,2 мл, с крышкой; РУ № РЗН 2023/20736)	белой субстанции					
Разбавитель	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 пробирка (1,5 мл)	1 пробирка (1,5 мл)	-	-	1 пробирка (1,5 мл)
Положительный контрольный образец (ПКО-ВИЧ1-РНК)	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	-	-	1 пробирка (0,2 мл)	1 пробирка (0,2 мл)	
Положительный контрольный образец (ПКО-ВИЧ1-РНК- ЛИО)	Лиофилизирова ная смесь белого или серого цвета	1 пробирка (лиофили зат из 0,5 мл)	1 пробирка (лиофилизат из 0,5 мл)	-	-	1 пробирка (лиофилиз ат из 0,5 мл)
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 пробирка (1,5 мл)	1 пробирка (1,5 мл)	1 пробирка (0,2 мл)	1 пробирка (0,2 мл)	1 пробирка (1,5 мл)
Внешний вид компонентов для экстракции						
Лизирующий раствор	Прозрачная жидкость от бесцветного до жёлтого цвета (может кристаллизоваться)	1 флакон (30,0 мл)	1 флакон (30,0 мл)	1 флакон (30,0 мл)	1 флакон (30,0 мл)	1 флакон (30,0 мл)
Сорбент	Суспензия магнитных частиц коричневого цвета	1 пробирка (0,5 мл)	1 пробирка (0,5 мл)	1 пробирка (0,5 мл)	1 пробирка (0,5 мл)	1 пробирка (0,5 мл)
Раствор 1	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 флакон (30,0 мл)	1 флакон (30,0 мл)	1 флакон (30,0 мл)	1 флакон (30,0 мл)	1 флакон (30,0 мл)
Раствор 2	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 флакон (60,0 мл)	1 флакон (60,0 мл)	1 флакон (60,0 мл)	1 флакон (60,0 мл)	1 флакон (60,0 мл)
Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 флакон (15,0 мл)	1 флакон (15,0 мл)	1 флакон (15,0 мл)	1 флакон (15,0 мл)	1 флакон (15,0 мл)
Отрицательный контроль экстракции (ОКЭ)	Прозрачная бесцветная жидкость без	1 флакон (5,0 мл)	1 флакон (5,0 мл)	1 флакон (5,0 мл)	1 флакон (5,0 мл)	1 флакон (5,0 мл)

	посторонних включений					
Концентрирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 флакон (50,0 мл)	1 флакон (50,0 мл)	1 флакон (50,0 мл)	1 флакон (50,0 мл)	1 флакон (50,0 мл)
Инструкция по применению		1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.

Примечание:

1. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

2. В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Компоненты набора упакованы в коробку.

В комплект поставки входят: набор реагентов, паспорт.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Комплекты №№1,2; Форма 1 - пробирки с лиофилизированной реакционной смесью.

Комплекты №№1,2; Форма 2 - планшет для ПЦР с пленкой, лиофилизированная смесь.

Комплекты №№1,2; Форма 3 - пробирки, реакционная смесь под воском.

Комплекты №№1,2; Форма 4 - пробирки 0,2 мл для ПЦР в стрипах, реакционная смесь под воском.

Комплекты №№1,2; Форма 5 - пробирки 0,2 мл для ПЦР в стрипах, лиофилизированная смесь

Каждая форма Комплекта № 1 набора реагентов «ВИЧ1 ЭК РНК ЭКС» рассчитана на проведение исследований 96 образцов, включая контрольные.

Каждая форма Комплекта № 2 набора реагентов «ВИЧ1 ЭК РНК ЭКС» рассчитана на проведение исследований 48 образцов, включая контрольные.

Методы стерилизации изделия

Изделие не требует стерилизации.

Программное обеспечение работы изделия

Отсутствует.

Техническое обслуживание и ремонт изделия

Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО), проведения обратной транскрипции РНК ВИЧ-1 и амплификации участков к ДНК ВИЧ-1 и ДНК эндогенного ВКО с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

Экстракция РНК из биологического материала проводится в присутствии эндогенного внутреннего контрольного образца (ВКО), который позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

Эндогенный ВКО позволяет не только контролировать все этапы ПЦР-исследования, но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения.

Введена впервые

В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой РНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. К олигонуклеотидным зондам, специфичным к различным РНК-мишеням, прикреплены различные флуоресцентные метки. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации каждой РНК-мишени путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по соответствующему каналу. По каналу, соответствующему флуорофору HEX/Yellow, детектируется продукт амплификации РНК ВИЧ1.

По каналу, соответствующему флуорофору FAM/Green, детектируется продукт амплификации ВКО, который позволяет контролировать выполнение процедуры выделения НК РНК для каждого образца.

По каналу, соответствующему флуорофору HEX/Yellow, детектируется продукт амплификации РНК ВИЧ1.

(ПКО-ВИЧ1-РНК-ЛИО) и (ПКО-ВИЧ1-РНК) детектируется по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green (ВКО) и HEX/Yellow (РНК ВИЧ1).

Эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать все этапы ПЦР-исследования, но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения. Детекция ВКО в ходе реакции амплификации свидетельствует о наличии в исследуемом образце клинического материала.

Детекция результатов ПЦР осуществляется без извлечения продуктов реакции из пробирок, что позволяет свести к минимуму риск контаминации продуктами ПЦР. Дополнительным преимуществом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией является возможность автоматизировать интерпретацию результатов анализа, снизить субъективизм в интерпретации результатов.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Материалом для исследования служат образцы, плазмы крови (с К₃ЭДТА) и сыворотки крови человека, из которых выделяются препараты РНК для последующего исследования в ПЦР.

Объем анализируемого образца для ОТ-ПЦР составляет 15 мкл.

Объем плазмы крови (с К₃ЭДТА) и сыворотки крови человека для экстракции НК составляет не менее 200 мкл.

Все образцы, собранные для лабораторных исследований, должны рассматриваться как потенциально инфицированные, и медицинский персонал, который собирает или перевозит клинические образцы, должен строго соблюдать требования биологической безопасности как при работе с микроорганизмами II-IV групп патогенности.

Перевозка образцов должна осуществляться в соответствии с требованиями санитарного законодательства по отношению к микроорганизмам II-IV групп патогенности в специальном контейнере с охлаждающими элементами.

Отбор проб, упаковку и транспортирование осуществляют в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (Приложение 2 «Забор, предварительная обработка, хранение и перевозка материала на исследование») и СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала

Взятие материала (для исследования вирусной РНК). Для проведения анализа используется плазма периферической крови человека. Взятие крови проводится утром натощак в пробирку с 3 % раствором с К₃ЭДТА из расчета 1:20. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 6 ч с момента взятия крови человека следует

отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g. Хранить плазму крови человека можно не более 5 сут. при температуре от 2 до 8 °С или не более года при температуре -20°С и длительно при температуре не выше минус 70°С. Допускается только однократное замораживание-оттаивание плазмы крови человека.

При проведении анализа и использовании сыворотки крови человека. Хранить сыворотку крови человека не более 5 суток при температуре от 2 до 8 °С или не более года при температуре -20°С и длительно – при температуре не выше минус 70 °С. Допускается только однократное замораживание-оттаивание сыворотки крови человека.

После завершения сбора образцов от больного (больных) все инструменты и подсобные материалы, а также использованные средства индивидуальной защиты (перчатки, халат и пр.) дезинфицируют согласно требованиям СанПин 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" и МУ-287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

Внимание! Следует рассматривать пробы клинического материала, как потенциально инфекционно-опасные.

Внимание! Пробы клинического материала, в отношении которого были выявлены нарушения требований данного раздела инструкции, считаются непригодными для исследования.

Согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащих микроорганизмы I-IV групп патогенности» условия хранения и транспортирования образцов плазмы и сыворотки крови:

- при температуре от 2 до 8 °С - в течение 5 сут.;
- при температуре -20 °С - в течение года;
- при температуре -70 °С - длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала, поэтому образцы плазмы для длительного хранения желательно разлить небольшими (0,1—0,2 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл

Пробы клинического материала, хранившиеся в холодильнике/морозильнике, перед анализом прогреть до температуры (20 – 28) °С и аккуратно перемешать.

Избегать повторных циклов замораживания/оттаивания проб клинического материала.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чистота препарата РНК

При анализе отношения поглощения длин волн 260 нм и 280 нм (260–280 нм) определяли чистоту препарата РНК. Препарат считался чистым, если отношение значений оптических плотностей 260/ 280 нм приблизительно равно 2.8 для РНК.

Эффективность выделения РНК

Оценку качества экстрагированной РНК определяли методом ПЦР-РВ, учитывая длину ампликона в целевой реакции. Определение эффективной концентрации проводили методом ПЦР-РВ.

Эффективность выделения РНК составляет не менее 95%.

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) составляет 20 МЕ/мл¹⁾, при выделении нуклеиновой кислоты из 1 мл анализируемого образца.

Примечание:¹⁾ данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в СОП-ПО-30-66 – порядок приготовления Контрольных образцов чувствительности («КОЧ РНК ВИЧ1 ЭКС» и «КОЧ РНК ВИЧ1-q»)

для наборов реагентов «ВИЧ1 ЭК РНК ЭКС» и «ВИЧ1 ЭК-г ЭКС» аттестованных относительно референтного материала, международного стандарта ВОЗ (NIBSC code: 16/194, WHO International Standard 4th HIV-1 International Standard).

Аналитическая специфичность

При исследовании образцов, не содержащих РНК ВИЧ1, но содержащих нуклеиновые кислоты вирусов гепатита А, В и С, цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барр, вируса ветряной оспы, вируса герпеса человека 6 типа и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Влияние потенциально интерферирующих веществ

На результат анализа не оказывает влияния наличие в образце потенциально интерферирующих веществ:

Антибиотиков в концентрации: левофлоксацина до 0,1 г/мл, азитромицина до 0,25 г/мл. Противовирусных препаратов в концентрации: валацикловира до 2,24 мкг /мл, долутегавира до 20,4 нг/мл.

Гемоглобина до концентрации 6 г/л

Билирубина до концентрации 211 мкмоль/л

Триглицеридов до концентрации 38 ммоль/л

Воспроизводимость

Внутрисерийная воспроизводимость результатов определялась тестированием 10 положительных образцов, полученных внесением искусственного защищенного специфического фрагмента РНК ВИЧ1 (КОЧ-контрольный образец чувствительности) в отрицательные образцы клинического материала, в 10 повторах на наборах реагентов одной серии, коэффициент вариации (КВ) не превышает 8%.

Межсерийная воспроизводимость результатов определялась тестированием 10 положительных образцов, полученных внесением искусственного защищенного специфического фрагмента РНК ВИЧ1 (КОЧ-контрольный образец чувствительности) в отрицательные образцы клинического материала, в 10 повторах на наборах реагентов разных серий, коэффициент вариации (КВ) не превышает 8%

Эффективность выявления различных типов, субтипов, рекомбинантных форм ВИЧ-1 подтверждена анализом 2-й международной референсной панели ВОЗ субтипов ВИЧ-1 (NIBSC код 12/224, включает группу М субтипы А, В, С, D, CRF 01_AE, F, G, AG-GH, группа N и группа О) и 1-й международной референсной панели ВОЗ циркулирующих рекомбинантных форм (CRF) ВИЧ-1 (NIBSC код 13/214).

Аналитическая чувствительность набора реагентов «ВИЧ1 ЭК РНК ЭКС» - 20 МЕ/мл из 1 мл образца была подтверждена в ходе клинических испытаний медицинского изделия на образцах клинического материала, в том числе и на сероконверсионных образцах.

Диагностические характеристики

Диагностическая чувствительность набора реагентов (с доверительной вероятностью 95%) составила 100% [98,93% - 100%].

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении РНК различных субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ1 (с доверительной вероятностью 95%) составила:

- для субтипа А группы М - 100% [98,72% - 100%],
- для субтипа В группы М - 100% [93,15% - 100%],
- для субтипов: субтипа С группы М, субтипа D группы М, субтипа AE группы М, субтипа F группы М, субтипа G группы М, субтипа В группы М, субтипа AG-GH группы М, субтипа J группы М, группы N, группы О - 100% [69,15% - 100%],
- для рекомбинантных форм ВИЧ 1 типа - 100% [69,15% - 100%].

Диагностическая специфичность набора реагентов (с доверительной вероятностью 95%) составила 100% [99,02% - 100%].

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с РНК могут наблюдаться ложноотрицательные реакции.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р ИСО 15190-2023 "Лаборатории медицинские. Требования безопасности".

Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" 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".

Раствор 2, содержащий 96% этиловый спирт, легковоспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси. Следует беречь от источников воспламенения/нагрева/искр/открытого огня, соблюдать условия хранения набора реагентов.

Этиловый спирт при попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. Следует промыть глаза не менее 10 минут большим количеством чистой проточной воды, при этом держать глаза открытыми. Если раздражение глаз не проходит обратиться за медицинской помощью.

При работе с набором реагентов необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Требования к помещениям, оборудованию, расходным материалам.

Температура в помещениях лаборатории при проведении исследований должна быть от 20 до 28 °С, относительная влажность - от 15 до 75 %.

Исследования проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса.

Каждый этап анализа должен проводиться в специально выделенных рабочих зонах (помещениях). Лабораторный процесс должен быть однонаправленным (работу следует начинать в зоне (помещении) экстракции, продолжать в зонах (помещениях) амплификации и детекции).

Запрещается перемещать лабораторное оборудование, дозаторы, штативы, посуду, рабочую одежду, головные уборы и др. из одного помещения в другое.

Дозаторы и другое измерительное и дозирующее оборудование должны быть поверены и промаркированы.

При работе с РНК необходимо использовать микропробирки и наконечники, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Для манипуляций с набором реагентов, пробами клинического материала и анализируемыми образцами (пробами выделенной РНК) использовать одноразовые пробирки и наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером, одноразовые перчатки без талька.

Для каждой операции использовать новые наконечники с аэрозольным барьером.

Безопасность персонала

Все образцы, собранные для лабораторных исследований, должны рассматриваться как потенциально инфекционные, и медицинский персонал, который собирает или перевозит клинические образцы, должен строго соблюдать требования биологической безопасности как при работе с микроорганизмами II-IV групп патогенности.

При работе использовать средства индивидуальной защиты.

Тщательно вымыть руки по окончании работы.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПин 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

При работе с набором использовать средства индивидуальной защиты (блужон, брюки, халат, шапочку, тапочки или сабо, очки защитные, полумаску, одноразовые неопудренные перчатки, нарукавники одноразовые). Тщательно вымыть руки по окончании работы.

Все реагенты, входящие в состав компонентов набора реагентов в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают.

Сведения о дезинфекции и утилизации

Все использованные материалы, инструменты и оборудование, рабочие поверхности дезинфицировать в соответствии с требованиями СанПин 3.3686-21 и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

Все поверхности в лаборатории ежедневно подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СанПин 3.3686-21.

Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

Токсичные отходы не образуются в процессе использования и утилизации набора реагентов с истекшим сроком годности.

Отходы, образующиеся в процессе использования и утилизации набора реагентов с истекшим сроком годности, относить к классу Б.

Набор реагентов с истекшим сроком годности утилизировать как отходы класса Б.

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.

Неиспользованные компоненты, компоненты с истекшим сроком годности, а также использованные компоненты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий".

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы

- бокс биологической безопасности II класса защиты по ГОСТ Р ЕН 12469-2010, (например, Бокс бактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С." по ТУ 9443-004-51495026-2004;" ЗАО "Ламинарные системы", Россия, РУ № ФСР 2010/07114);
- амплификатор с детекцией результатов в режиме "реального времени":
- «CFX96» - Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, ООО «Био-Рад Лаборатории», Россия, РУ № ФСЗ 2008/03399;
- «QuantStudio 5» - Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени, «Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.», Сингапур, РУ № РЗН 2019/8446;
- «Rotor-Gene» – Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q, с принадлежностями, «КИАГЕН ГмбХ», Германия, РУ № ФСЗ 2010/07595;
- «ДТпрайм» - Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010; ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229;
- оптические пробирки для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики), адаптированные для используемого амплификатора (например, производитель "Сайентифик Спешиалтис Инкорпорейтед (ЭсЭсАй)", РУ №ФСЗ 2011/10287);
- Термостат твердотельный для пробирок объемом 1,5 и/или 2 мл с возможностью термостатирования при 70°C (например, Термостат твердотельный с таймером ТТ-2 "Термит" по ТУ 9452-004-46482062-2002; РУ № ФСР 2012/14090, производитель ООО "НПО ДНК-Технология");
- микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5 и/или 2 мл со скоростью вращения не менее 12 000 об/мин (например, MiniSpin, Eppendorf, РУ № РЗН 2016/4617; IEC MicroCL 17, АО "Термо Фишер Сайентифик" РУ № ФСЗ 2008/01225);
- вортекс - (например, вортекс персональный V-1 plus, РУ №ФСЗ 2011/09797, производитель SIA "Biosan", Латвия);
- набор дозаторов пипеточных механических одноканальных с варьируемым объемом дозирования 1-10 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (например, производитель "Сарториус Биохит Ликвид Хендлинг Ой", РУ №РЗН 2019/9356; АО "Термо Фишер Сайентифик", ТУ 9443-007-33189998-2007, РУ ФСР 2007/01095);
- одноразовые наконечники с фильтрами (Filter ерт.I.P.S. PCR clean) для дозаторов (например, производитель "Эппендорф АГ", РУ №ФСЗ 2009/04520);
- одноразовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5–2,0 мл; (например, пробирки Safe-Lock PCR clean с защелкой, объемом от 0,5мл до 2,0мл (Safe-Lock PCR clean tubes 0,5-2,0ml), РУ №ФСЗ 2009/04520; производитель "Эппендорф АГ");
- холодильник от +2 °С до +8 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С (например, производитель АО "ПОЗнС", РУ №ФСР 2012/13773);
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников (например, ЗАО "ПТП Киль", РУ №ФСР 2007/00917);
- штативы для пробирок и наконечников (например, производитель "Эппендорф АГ", РУ №ФСЗ 2009/04520);
- пробирка центрифужная типа Эппендорф из полипропилена, Россия, ООО «МиниМед», РУ № РЗН 2015/2596;
- аспиратор с сосудом-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, Аспиратор с сосудом-ловушкой FTA-1; SIA «Biosan», Латвия, РУ № ФСЗ 2011/09791);
- Спектрофотометры серии ПЭ по ТУ 9443-001-5627822-2009; Модель ПЭ-5300ВИ (ООО "ЭКРОСХИМ", Россия, РУ №ФСР 2010/07089).
- магнитный штатив "рабочее место" (например, Магнитный штатив для осаждения магнитных частиц при проведении экстракции нуклеиновых кислот из биологического

материала человека по ТУ 32.50.50-001-58473051-2020, ООО «ИЛС», Россия, РУ №РЗН 2022/16917);

- Автоматическая станция для экстракции НК открытого типа:

- Auto-Pure 96 - Система для автоматического выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологических образцов человека Auto-Pure 96; "Ханчжоу Аошенг Инструментс Ко., Лтд.", Китай, РУ № РЗН 2021/14263,

- King Fisher - Процессор магнитных частиц для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков KingFisher; "Термо Фишер Сайентифик Ой", Финляндия, РУ № ФСЗ 2009/05562;

- Гребенка для глубоколоночного планшета (например, например, Гребенка к планшету ПЛ-2-96-2,2-ПП, АО «Перинт», Россия, РУ № РЗН 2021/16260);

- Глубоколоночный планшет, 96 лунок, объем лунки 2,2 мл (например, Планшет ПЛ-2-96-2,2-ПП, АО «Перинт», Россия, РУ № РЗН 2021/16260).

- комплект средств для обработки рабочего места.

Внимание! При работе с РНК необходимо использовать расходные материалы, имеющие специальную маркировку *RNase-free*, *DNase-free*.

Подготовка образцов

Производится выделение РНК в соответствии с Инструкцией по применению набора реагентов «ВИЧ 1 ЭК РНК ЭКС».

Внимание! Для повышения чувствительности рекомендуется проводить выделение РНК из 200 мкл образца.

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

Внимание! Не допускается исследование образцов гепаринизированной плазмы крови человека.

Элюирование проводить в 70 мкл (если вы используете ПЦР-смеси под воском) и в 200 мкл (если вы используете лиофилизированные ПЦР-смеси).

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА (выделение нуклеиновых кислот)

Процедура 1 (ручная постановка)

Выделение нуклеиновых кислот из образцов плазмы (с К₃ЭДТА) и сыворотки крови человека (100-200 мкл образца):

Лизирующий раствор при образовании кристаллов прогреть при 65⁰С до полного растворения кристаллов.

1. Внести в каждую пробирку **10 мкл Сорбента**, **600 мкл Лизирующего раствора**. В пробирку с ОКЭ добавить 100-200 мкл ОКЭ.
2. Добавить **100-200 мкл исследуемого образца**
3. Перемешать на вортексе и установить в термошейкер. Инкубировать 10 минут при +65 °С и 500 об/мин (если нет термошейкера, то поставить в термостат, типа «Термит» и перемешать на вортексе через 5 мин);
4. Сбросить капли с крышек пробирок кратким центрифугированием. Установить в магнитный штатив. Подождать 2 минуты. Удалить надосадочную жидкость.
5. Добавить **600 мкл Раствора 1**. Перемешать на вортексе в течение 10 секунд (до гомогенного состояния). Повторить шаг 4.
6. Добавить **600 мкл Раствора 2**. Перемешать на вортексе перемешать в течение 10 секунд (до гомогенного состояния) Повторить шаг 4.
7. Добавить еще раз **600 мкл Раствора 2**. Перемешать на вортексе перемешать в течение 10 секунд (до гомогенного состояния). Повторить шаг 4.

8. Установить пробирки с открытыми крышками в термоблок. Инкубировать в течение 5 минут при 65 °С.
9. Добавить 70 мкл Элюента (если вы используете 15 мкл для амплификации) или по 200 мкл (если вы используете 50 мкл для амплификации). Закрыть крышки пробирок! Перемешать на вортексе в течение 30 секунд.
10. Инкубировать в течение 5 минут при 65 °С.
11. Сбросить капли с крышек пробирок кратким центрифугированием. Установить в магнитный штатив. Подождать 30 секунд. Перенести над осадочную жидкость содержащую РНК/ДНК в новую пробирку.
Элюирующий раствор содержит очищенные РНК и ДНК, готовые для постановки обратной транскрипции и ПЦР.

Процедура 2 (автоматическая постановка)

Выделение нуклеиновых кислот из образцов плазмы (с К3ЭДТА) и сыворотки крови человека (100-200 мкл образца).

С помощью магнитоперемешивающих станций (например, Auto-Pure 96 (Hangzhou Allsheng Instruments Co.,Ltd., Китай), KingFisher Flex (Thermo FS, Финляндия), или аналогичные):

А) Розлив реагентов по планшетам:

1. В случае образования кристаллов прогреть Лизирующий раствор при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Разнести по лункам 1-го планшета Лизирующий раствор 600 мкл, Сорбент 10 мкл. В пробирку с ОКЭ добавить 100-200 мкл ОКЭ.
3. Разнести по лункам 2-го планшета Раствор 1 по 600 мкл.
4. Разнести по лункам 3-го планшета Раствор 2 по 600 мкл.
5. Разнести по лункам 4-го планшета Раствор 2 по 600 мкл.
6. Разнести по лункам 5-го планшета Элюент по 70 мкл (если вы используете 15 мкл для амплификации) или по 200 мкл (если вы используете 50 мкл для амплификации).
7. В каждую лунку планшета 1 с Лизирующим раствором и Сорбентом добавить по 100-200 мкл образца.

При необходимости в лунку для ОКЭ (отрицательный контроль экстракции), внести 100-200 мкл ОКО (отрицательный контрольный образец, поставляется вместе с тест-системами).

8. Установить все планшеты в прибор.

В) Запрограммировать прибор:

- Инкубация образца в планшете 1 происходит в течение 10 мин при температуре 65 °С при постоянном перемешивании;
- Инкубация образца в планшете 2 происходит в течение 1 мин при без термостатирования при постоянном перемешивании;
- Инкубация образца в планшете 3 происходит в течение 1 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании;
- Инкубация образца в планшете 4 происходит в течение 1 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании;
- Инкубация образца в планшете 5 происходит в течение 5 мин при 65 °С при постоянном перемешивании;
- Установить в прибор подготовленные планшеты и планшет с гребенкой согласно подсказкам/указателям расстановки.
- Запустить протокол экстракции НК

После окончания работы прибора, планшет с Элюирующим раствором извлечь. Элюирующий раствор содержит очищенные РНК и ДНК, готовые для постановки обратной транскрипции и ПЦР.

Примечание:

Протокол экстракции для автоматических магнитоперемешивающих станций размещен для ознакомления в информационно-телекоммуникационной сети Интернет на официальном портале производителя по адресу: <https://ekolab.ru/catalog/laboratornaya-dagnostik/>.

Выделение нуклеиновых кислот из 1 мл плазмы (с КзЭДТА) (ручная постановка и автоматическая)

1. В пробирку с 1 мл плазмы
2. Добавить 1 мл концентрирующего раствора.
3. Перемешать на вортрексе 30 сек
4. Оставить в штативе при комнатной температуре на 10 мин
5. Центрифугировать 5 мин при 3000 тыс. об/мин
6. Отобрать надосадочную жидкость в объеме 850 мкл

Осадок считать, как образец

Далее использовать процедуры № 1 и 2 (см. выше).

РНК можно использовать для амплификации - все формы Комплектов №№ 1,2.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА (постановка реакции амплификации)

1. Подготовка ПЦР-смеси

1.1 Достать пробирки (стриппы, планшеты).

1.2. Растворить ПКО-ВИЧ1-РНК-ЛИО (сухая смесь) в 500 мкл Разбавителя.

1.3. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов (N) должны входить 2 контрольных образца: отрицательный контрольный образец (ОКО) и положительный контрольный образец (ПКО-ВИЧ1-РНК или ПКО-ВИЧ1-РНК-ЛИО).

1.4. Внести в каждую пробирку (лунку стриппа/планшета) сверху на воск по 15 мкл экстрагированных РНК, а в сухую смесь по 50 мкл экстрагированных РНК.

1.5. Поставить контрольные реакции амплификации

В пробирки с отрицательным контролем – внести в пробирку (или лунку стриппа/планшета) сверху на воск - 15 мкл (ОКО), а в сухую смесь 50 мкл (ОКО)-отрицательный контрольный образец.

В пробирки с положительным контролем – внести сверху на воск- 15 мкл (ПКО-ВИЧ1-РНК), в сухую смесь – 50 мкл (ПКО-ВИЧ1-РНК-ЛИО).

В пробирки с отрицательным контролем – внести в пробирку (или лунку стриппа/планшета) сверху на воск - 15 мкл (ОКЭ), а в сухую смесь по 50 мкл (ОКЭ)-отрицательный контроль экстракции.

Герметично закрыть пробирки крышками. При наличии пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить их кратковременным центрифугированием.

2. Постановка реакции амплификации

2.1. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки (или стриппы/планшета) в амплификатор.

2.2. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор, как указано в табл. 2

Параметры амплификации

Шаг	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	55	15 мин	1
2	95	10 мин	1
3	95	10 сек	5
4	60	15 сек	
5	67	15 сек	
6	95	10 сек	40
7 Детекция по каналам: FAM/Green, HEX/Yellow	60	15 сек	
8	67	15 сек	

2.3. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончании, если это позволяет программное обеспечение прибора.

2.4. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента). Запустить амплификатор.

2.4.1. Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для всех каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5Fl и «MaxReading/Максим. Сигнал» – 10Fl.

2.4.2. На амплификаторе «Quant Studio 5» во вкладке «Properties» выбрать в поле Rune mode «Fast» (Быстрый) во вкладке «Plate» - «Advanced Setup» в качестве канала детекции ВИЧ1 необходимо выбрать VIC (соответствует каналу HEX по длинам волн флуоресценции).

2.4.3. Для прибора «CFX96» В окне Run Setup во вкладке Protocol нажать кнопку Select Existing, в окне Select Protocol выбрать необходимый файл с программой амплификации, нажать кнопку Открыть. В окне Run Setup перейти во вкладку Plate, нажать кнопку Select Existing, в окне Select Plate выбрать необходимый файл со схемой планшета, нажать кнопку Открыть. Отредактировать схему, нажав на кнопку Edit selected. Во вкладке Select Fluorophores, выбрать в колонке Selected флуорофоры, указанные в инструкции по применению набора. В меню Sample type выбрать Unknown для всех образцов. Запустить выполнение программы, нажав на кнопку Start Run.

2.4.4. Для прибора «ДТпрайм» введите необходимые комментарии об особенностях и характеристиках предстоящего запуска, а также объем рабочей смеси в пробирке; Убедившись, что прибор включен и взаимодействует с компьютером, о чем свидетельствует желтый или зелёный индикатор в статусной строке программы, запустите программу амплификации нажатием кнопки Запуск программы.

Примечание:

Проведение реакции амплификации на приборах «CFX96»; «Quant Studio 5»; «Rotor-Gene»; «ДТпрайм» можно провести вручную с помощью прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией к набору реагентов или с применением сервисной компьютерной программы «ЭКОлаб analysis», размещенной в информационно-телекоммуникационной сети Интернет на официальном портале производителя по адресу: <https://ekolabmu/catalog/laboratornayq-diagnostik/>.

3. Анализ результатов

3.1. Флуоресцентный сигнал амплификации специфического фрагмента РНК вируса ВИЧ1 регистрируется по каналу HEX/Yellow. Флуоресцентный сигнал амплификации внутреннего контроля (ВКО) регистрируется по каналу FAM/ Green.

3.2. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

3.2.1. Для приборов типа «Rotor-Gene»**:

- На панели «Просмотр» войти во вкладку «Анализ» в открывшемся окне выбрать нужный канал детекции, нажать «Показать». На панели окна «Анализа» выбрать «Линейная шкала»

- установить значение параметра выбросов («NTC threshold/Порог Фона») – 5%.

- установить значение параметра пороговой линии («Threshold/Порог») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02–0,2**;

- при необходимости допускается активация функций «Dynamic tube/Динамич.фон» и «Slope Correct/Коррек. Уклона».

3.2.2. Для приборов «CFX96»*:

- установить значение параметра пороговой линии («Single Threshold») – 50.

- при необходимости допускается активация функций «Apply Fluorescence Drift Correction» и «Baseline Subtracted Curve fit».

3.2.3. Для приборов «Quant Studio 5»*:

- установить значение параметра пороговой линии 5 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации.

3.2.4. Для приборов «ДТ прайм»

- установить «Метод» – «Пороговый (Ct)»;

- установить значение параметра пороговой линии 5 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0–30%.**

* в зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.

** Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.

3.2.5. Набор реагентов «ВИЧ1 ЭК РНК ЭКС» валидирован со всеми указанными амплификаторами.

3.3. Выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

3.4. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в табл. 3.

Таблица 3

Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	Контролируемый этап анализа	Значение «Ct» по каналу FAM/Green	Значение «Ct» по каналу HEX/Yellow
(ОКО) (ОКЭ)	ПЦР	Не детектируется	Не детектируется
(ПКО-ВИЧ1-РНК) (ПКО-ВИЧ1-РНК-ЛИО)	ПЦР	≤ 35	≤ 35
(ВКО)	ПЦР	≤ 35	Не детектируется

В случае несоответствия контрольных точек ОКО, ОКЭ и ПКО необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии постановки ПЦР.

Введена впервые

3.5. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с табл. 4.

Таблица 4

Таблица интерпретации результатов исследования образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу FAM/Green (ВКО)	Значение «Ct» по каналу HEX/Yellow (РНК ВИЧ1)
Положительный	+/-	≤ 38
Отрицательный	+	Не детектируется
Невалидный	-	-

Примечание:

«-» обозначает отсутствие значения «Ct», график амплификации не пересекает пороговую линию.

«+» обозначает наличие значения «Ct», график амплификации пересекает пороговую линию.

«+/-» – значение «Ct» для данного канала не анализируется.

В случае невалидного результата требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа внесения клинического материала в ПЦР-смесь или со стадии забора материала у пациента.

Повторный невалидный результат свидетельствует о некачественном отборе клинического материала и требует проведения еще одного полного цикла исследования, начиная с этапа отбора клинического материала.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора реагентов «ВИЧ1 ЭК РНК ЭКС» – 12 месяцев с даты приемки ОБТК предприятия-изготовителя. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Хранение компонентов для амплификации и экстракции: все формы комплектов №№1,2 в упаковке предприятия изготовителя при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.

После вскрытия неиспользованные компоненты допускается хранить в плотно закрытых упаковках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от 2 °С до 8 °С до истечения срока годности.

Транспортирование

При температуре от 2 до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, не более 5 суток.

Набор реагентов, транспортируемый с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

«Набор реагентов для выделения и качественного определения РНК вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ1) в клиническом материале методом ПЦР в режиме реального времени «ВИЧ1 ЭК РНК ЭКС» по ТУ 20.59.52-370-70423725-2024» соответствует национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности.

Введена впервые

По вопросам, касающимся качества и обращения набора реагентов «ВИЧ1 ЭК РНК ЭКС» следует обращаться: Акционерное Общество «ЭКОлаб» (АО «ЭКОлаб»); Юридический адрес: 142530, Московская область, г. о. Павлово-Посадский, г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1;

Место производства: 142530, Московская область, г.о. Павлово-Посадский, г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1а, тел. 8(800)333-33-47, ekolab-sekretar@mail.ru.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов заявленным для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия потребитель должен предоставить:

- набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
- все спорные исследуемые образцы клинического материала от пациентов;
- протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.
- протоколы исследования с использованием других методов или наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

Перечень, применяемых национальных стандартов

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования;

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний;

ГОСТ Р 51088-2013 "Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации";

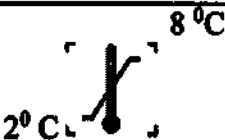
ГОСТ Р ИСО 23640-2015 "Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*";

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования;

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка) Часть 2. Реагенты для диагностики *in vitro* для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 17511-2022 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Требования к установлению метрологической прослеживаемости значений, приписанных калибраторам, контрольным материалам правильности и образцам биологического материала человека.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА УПАКОВКЕ И ЭТИКЕТКАХ

Символ	Значение символа
	Изготовитель
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Температурный диапазон
	Дата изготовления

		
		Код партии
		Номер по каталогу
		Содержимого достаточно для проведения <n> тестов
		Использовать до
		Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
		Верх
		Беречь от влаги
		Хрупкое. Осторожно
		Осторожно
		Легковоспламеняющаяся жидкость

Начальник НПО ПЦР

Жигалева

О.Н. Жигалева

«СОГЛАСОВАНО»

Директор АО «ЭКОлаб» по научной работе

" 31 " 07 2024 г.



С.Г. Марданлы

Введена впервые

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

лист а

Ген. директор АО "ЭКОлаб"

Гашенко Т.Ю.

" 31 " 09 " 2024 г.

