



Т.Ю. Гашенко
2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

медицинского изделия для диагностики *in vitro*

**«Набор реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ1) в клиническом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией»
«ВИЧ1 ЭК-q»**

НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ1) в клиническом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией» «ВИЧ1 ЭК-q» предназначен для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ1) в образцах плазмы крови (с К₃ЭДТА) человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Функциональное назначение набора реагентов «ВИЧ1 ЭК-q» - определение вирусной нагрузки в диагностике инфекции, вызванной вирусом иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ1).

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

Полученные результаты анализа предоставляют данные о наличии или отсутствии РНК вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ1) и его концентрации (вирусной нагрузке) в пробах клинического материала.

Набор реагентов «ВИЧ1 ЭК-q» предназначен для однократного применения.

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 допускаются сотрудники лаборатории, имеющие среднее или высшее образование (медицинское, биологическое, 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-q» показано для оценки наличия или отсутствия НК ВИЧ1 в исследуемом образце и при необходимости определения концентрации РНК вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ1) (вирусной нагрузки).

Выявление РНК ВИЧ1:

- скрининг донорской крови (в Сан Пин 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)

НК 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 набора реагентов.

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 ВИЧ1-инфицированного.

Качественное определение РНК позволяет обнаружить ВИЧ1-инфекцию до появления детектируемого уровня антител к ВИЧ1. У лиц с установленной ВИЧ1-инфекцией количественное измерение уровня РНК ВИЧ1 в крови используют в целях прогноза и контроля антиретровирусной терапии.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Набор реагентов «ВИЧ1 ЭК-q» выпускается в двух формах (форма 1 без планшета для ПЦР и пленки и форма 2 с планшетом для ПЦР и пленкой для ПЦР).

Наименование компонента	Характеристика компонента	Количество компонента	
		Форма 1	Форма 2
Смесь 1	Прозрачная жидкость без посторонних включений	пробирка (1,1 мл)	пробирка (1,1 мл)
Смесь 2	Прозрачная жидкость без посторонних включений	1 пробирка (1,1 мл)	1 пробирка (1,1 мл)
Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная жидкость без посторонних включений	1 пробирка. (0,5 мл)	1 пробирка. (0,5 мл)
Положительный контрольный образец (ПКО2)	Прозрачная жидкость без посторонних включений	1 пробирка. (0,5 мл)	1 пробирка. (0,5 мл)
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная жидкость без посторонних включений	1 пробирка (1,0 мл)	1 пробирка (1,0 мл)
Внутренний контрольный образец (ВКО)	Прозрачная жидкость без посторонних включений	1 пробирка (1,0 мл)	1 пробирка (1,0 мл)
Планшет для ПЦР	Планшет на 96-лунок стандартного профиля для проведения ПЦР	-	1 шт.
Пленка для ПЦР-планшета.	Клейкая плёнка для проведения ПЦР в режиме реального времени	-	1 шт.
Инструкция по применению		1 шт.	1 шт.

Примечания:

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 и файл Excel в электронном виде для расчета концентрации РНК ВИЧ1 в исследуемых и контрольных образцах.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Каждая форма набора реагентов «ВИЧ1 ЭК-q» рассчитана на проведение исследование 96 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

Выявление микроорганизмов методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя амплификацию фрагмента НК данного вируса при помощи специфичных к нему праймеров и фермента Taq-полимеразы и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР.

При выявлении РНК ВИЧ принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК с последующей амплификацией кДНК.

В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации каждой ДНК-мишени путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по соответствующему каналу.

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

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

ПКО 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 гибридационно-флуоресцентной детекцией

Введена впервые

является возможность автоматизировать интерпретацию результатов анализа, снизить субъективизм в интерпретации результатов.

Преимуществом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией являются также широкие возможности проведения мультиплексного ПЦР-анализа, т.е. одновременное проведение амплификации и детекции НК нескольких микроорганизмов в одной и той же постановке. При этом благодаря проведенной оптимизации сохраняется высокая чувствительность в отношении каждой из выявляемых ДНК-мишеней. Использование мультиплексной ПЦР позволяет повысить производительность выполнения анализа в три-четыре раза без увеличения приборной базы лаборатории.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Материалом для исследований служат образцы плазмы крови (с К₃ЭДТА) человека из которых экстрагируется РНК.

Объем плазмы крови (с К₃ЭДТА) человека для экстракции НК составляет 100-1000 мкл. Материалом для проведения ПЦР служат пробы РНК, выделенной из плазмы крови человека, в количестве 15 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 МУ 3.4.2552-09 «Организация и проведение первичных противоэпидемических мероприятий в случаях выявления больного (трупа), подозрительного на заболевания инфекционными болезнями, вызывающими чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения» и СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Взятие, хранение и транспортировка биоматериала плазма периферической крови человека.

Взятие биоматериала (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. Допускается только однократное замораживание-оттаивание плазмы крови человека.

Сразу после взятия пробы пробирки маркируют, указывая фамилию и инициалы больного, возраст, день болезни, вид материала (например, кровь, корочки и т.д.) и дату его взятия.

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 которых 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:

- 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

Аналитическая чувствительность с использованием «КОЧ РНК ВИЧ1-q» (контрольный образец чувствительности, аттестованный относительно значений 2-го международного стандарта ВИЧ-1 ВОЗ (NIBSC code: 97/650),) составляет 20 МЕ/мл*

***Примечание:** данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в инструкции по применению набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот; например Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб» Амписенс по ТУ 9398-106-01897593-2012, РУ № ФСР 2010/07265, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, или Экстракция РНК с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG, Амписенс РУ № ФСЗ 2010/07645, "биоМерье СА", Франция или Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008, РУ № ФСР 2008/03147.

Аналитическая специфичность

При исследовании образцов, не содержащих РНК ВИЧ1, но содержащих НК 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

Введена впервые

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 20 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 20 повторах на наборах реагентов нескольких 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-GN, группа N и группа O) и 1-й международной референсной панели ВОЗ циркулирующих рекомбинантных форм (CRF) ВИЧ-1 (NIBSC код 13/214).

Аналитическая чувствительность Набора реагентов «ВИЧ1 ЭК-q» 20 МЕ/мл 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: 99,26 % - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность набора реагентов: 99,23 % - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с РНК/кДНК, 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 52905-2007 "Лаборатории медицинские".

Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования с 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".

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 %.

Введена впервые

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.

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

Сбор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами II-IV групп патогенности.

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.

Набор реагентов не содержит материалы биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным и влияющим на репродуктивную функцию человека действием. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности набор реагентов безопасен.

Весь исследуемый клинический материал является потенциально инфицированным, поэтому при работе с ним необходимо использовать индивидуальные средства защиты: лабораторные перчатки, лабораторные халаты, шапочку, очки защитные, полумаску, нарукавники одноразовые.

Сведения о дезинфекции и утилизации

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, " 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;

- «ДТпрайм» – Амплификатор детектирующий «ДТ прайм», ООО «НПО ДНК-Технология» Россия, РУ № ФСР 2011/10229;

- 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;

- оптические пробирки для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики), адаптированные для используемого амплификатора (например, производитель "Сайентифик Спешиалтис Инкорпорэйтед (ЭсЭсАй)", РУ №ФСЗ 2011/10287);

- твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 и/или 2 мл с возможностью термостатирования при 70 °С (например, «Термит» с таймером ТТ-2, 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");

- 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 ерT.L.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°C до +8 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С (например, производитель АО "ПОЗиС", 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;
- комплект средств для обработки рабочего места.

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

Подготовка образцов

Проводят экстракцию РНК, используя комплекты реагентов, рекомендованные в РФ в соответствии с инструкцией к используемому набору, например Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб» Амписен, или Экстракция РНК с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG, Амписенс или Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»

Внимание! Для повышения чувствительности рекомендуется проводить выделение РНК не менее, чем из 250 мкл образца.

Внимание! Не допускается исследование образцов гепаринизированной плазмы.

Проведение анализа

Выделение РНК из клинического материала производится совместно с ВКО (10 мкл на образец)

1. Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать (перевернув пробирки несколько раз) и собрать капли с помощью кратковременного центрифугирования.

1. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов должны входить 4 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (ОКО), положительный контроль ПЦР (ПКО, ПКО2), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ) не входит в состав комплекта.

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить «Мастер Микс»:

10x(N+1) мкл Смесь 1 + 10 x(N+1) мкл Смесь 2

где N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов. Допускается округление значений в большую сторону.

II. Перемешать «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в пробирки или лунки планшета для проведения ПЦР.

III. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки (или лунки планшета) добавить по 15 мкл РНК исследуемых образцов.

IV. Поставить контрольные реакции амплификации:

1. – внести в пробирку (или лунку планшета) 15 мкл ОКО;
2. – внести в пробирку (или лунку планшета) 15 мкл ПКО;
3. – внести в пробирку (или лунку планшета) 15 мкл ПКО2;
4. – внести в пробирку (или лунку планшета) 15 мкл ОКЭ.

где ОКЭ – отрицательный контроль экстракции – содержимое пробирки, в которой проведен процесс выделения РНК без добавления клинического материала, но с добавлением 10 мкл ВКО.

Герметично закрыть пробирки крышками (или заклеить планшет сверху специальной пленкой для ПЦР плашек). В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием.

2.3. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

I. Поместить подготовленные для проведения ОТ-ПЦР пробирки (или планшеты) в амплификатор.

II. В соответствии с Инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно Таблице 2.

Таблица 2. Параметры амплификации

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

III. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок (или исследуемых образцов, внесенных в лунки планшета) в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончании, если это позволяет программное обеспечение прибора.

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

Примечание*:

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 «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10Fl.

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

Для прибора «ДТпрайм» войти во вкладку «Настройки» в ней найти «экспозиция измерений» и установить значение 3000 для всех каналов. Далее войти в «разное» и во вкладке «Коэффициент преобразования» установить 7,0. Во вкладке «Фильтр» поставить галочку и установить границы валидности равными 97.

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*.

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»:

- установить значение параметра выбросов («NTC threshold/Порог Фона») – 5%.
- установить значение параметра пороговой линии («Threshold/Порог») – 0,02.
- при необходимости допускается активация функций «Dynamic tube/Динамич.фон» и «Slope Correct/Коррек. Уклона».

3.2.2. Для приборов «Bio-Rad 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 «ДТ-прайм»:

- установить «Метод» – «Пороговый (Ct)»;
- установить значение параметра пороговой линии 5 %, полученного для образца ПК0 в последнем цикле амплификации.

3.2.4. Для приборов «Quant Studio 5»:

- установить значение параметра пороговой линии 5 %, полученного для образца ПК0 в последнем цикле амплификации.

3.2.5. Набор реагентов «ВИЧ1 ЭК-q» 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	ПЦР	Не детектируется	Не детектируется
ПК0, ПК02	ПЦР	≤ 35	≤ 35
ОКЭ	ПЦР	Не детектируется	Не детектируется

В случае несоответствия контрольных точек ОКО и ПК0 необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии постановки ПЦР.

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

Примечания:

«-» 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.

V. Количественный анализ результатов

Количественный учет концентрации РНК вируса иммунодефицита человека 1 типа производится в автоматическом режиме в Excel файле с помощью формулы расчёта. Полученные значения Ct (значения преодоления пороговой линии) используют для расчета концентрации РНК ВИЧ1 в исследуемых и контрольных образцах по формуле в Excel файле в автоматическом режиме. Файл отправляется на электронную почту лаборатории, которая покупает набор.

СРОК ГОДНОСТИ

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

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение компонентов для амплификации: Смесь 1, Смесь 2, положительные контрольные образцы (ПКО, ПКО2); отрицательный контрольный образец (ОКО) и внутренний контрольный образец (ВКО) должно осуществляться в морозильных камерах или морозильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, в упаковке предприятия изготовителя при температуре от -24 °С до -16 °С в течение всего срока годности.

После вскрытия неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в морозильных камерах или морозильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, при температуре от -24 °С до -16 °С до истечения срока годности. Допускается десятикратное замораживание-оттаивание этих компонентов набора.

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 30 суток.

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

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

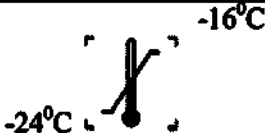
«Набор реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ1) в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией» «ВИЧ1 ЭК-q» соответствует ТУ 21.20.23-354-70423725-2023 с изм. № 1, национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности.

По вопросам, касающимся качества и обращения набора реагентов «ВИЧ1 ЭК-q», следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, 1а, Акционерное Общество «ЭКОлаб» (АО «ЭКОлаб»); тел. 8 (49643) 3-23-11, 3-30-93, тел/факс 8(49643) 3-30-85, 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.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА УПАКОВКЕ И ЭТИКЕТКАХ

	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Предел температуры
	Дата изготовления
	Код партии
	Номер по каталогу

 96	Содержимого достаточно для проведения 96- тестов
	Использовать до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Запрет на повторное применение
	Беречь от влаги
	Хрупкое, обращаться осторожно

Директор АО «ЭКОлаб» по научной работе

«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

" 06 " 10 2023 г.

С.Г. Марданлы

Н.К. Варнавичус





ПРОЦЕДУРА
В КОЛИЧЕСТВЕ 15 ЛИСТОВ

«06» 10 2023 год

Ген. Директор
ООО «БЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

15 лист 06

Ген. директор АО "ЭКОлаб"

Гашенко Т.Ю.

"06" 10 2023 г.