УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НекстБио»

_____ М. Е. Сенина

30.11.2023

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА ПЕРВОГО ТИПА (HIV-1) МЕТОДОМ ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» «АМПЛИПРАЙМ® HIV» ПО ТУ 21.20.23-211-09286667-2023

Инструкция по применению версии 30.11.23-1

Лист утверждения

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

IVD

Набор реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека первого типа (HIV-1) методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® HIV»
по ТУ 21.20.23-211-09286667-2023

АмплиПрайм® HIV

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ 3
1. НАЗНАЧЕНИЕ 4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА 4
2.1. Формы выпуска, состав и комплектность 4
2.2. Принцип метода 7
2.3. Прослеживаемость значений калибраторов 8
2.4. Техническое обслуживание и ремонт 8
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА 8
3.1. Внутренний контроль качества 8
3.2. Рекомендуемые контрольные материалы 9
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ 10
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ 10
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ 12
6.1. Взятие и предварительная обработка исследуемого материала 12
6.2. Экстракция РНК из исследуемых образцов 12
6.3. Обратная транскрипция, амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов 12
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ 13
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ 14
8.1. Экстракция РНК из исследуемого материала 14
8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР 17
8.3. Внесение проб РНК, проведение ОТ-ПЦР и детекции 18
8.4. Анализ и вычисление результатов 19
8.5. Интерпретация результатов 21
8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению 23
8.7. Диагностическое значение полученного результата 23
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА 24
9.1. Предел обнаружения 24
9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения 24
9.3. Аналитическая специфичность 24
9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения 25
9.5. Правильность измерения 25
9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность 26
9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ 26
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА 27
10.1. Срок годности 27
10.2. Транспортирование 27
10.3. Хранение 27
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 28
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 29

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	–	Cycle threshold (пороговый цикл)
HIV-1	–	*Human immunodeficiency virus* type 1
ВКО	–	внутренний контрольный образец
ВОЗ	–	всемирная организация здравоохранения
МЕ	–	международные единицы
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	–	дезоксирибонуклеаза
дНТФ	–	дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
кДНК	–	комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
ОТ-ПЦР	–	обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция
НК	–	нуклеиновая кислота
ПК1	–	положительный контрольный образец 1, калибратор ПКО-1 HIV или ПКО-1 HIV Lyo
ПК2	–	положительный контрольный образец 2, калибратор ПКО-2 HIV или ПКО-2 HIV Lyo
К-	–	отрицательный контроль ОТ-ПЦР
ОКО	–	отрицательный контрольный образец экстракции
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
РНКаза	–	рибонуклеаза
РУ	–	регистрационное удостоверение
ТУ	–	технические условия
УДГ	–	урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека первого типа (HIV-1) методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® HIV» по ТУ 21.20.23-211-09286667-2023.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® HIV», а также сокращение Набор реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® HIV» предназначен для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека первого типа (HIV-1) в плазме крови методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

1.2. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных в разделе инструкции «Дополнительное оборудование и материалы».

1.3. Функциональное назначение: Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (выявление и количественное определение РНК вируса иммунодефицита человека первого типа (HIV-1) методом ОТ-ПЦР в плазме крови).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования плазмы крови, полученной от лиц с диагнозом ВИЧ-инфекция (после положительного серологического теста), для диагностики ВИЧ-инфекции, а также для скрининга и мониторинга эффективности лечения ВИЧ-инфекции. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

1.5. Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Формы выпуска, состав и комплектность

Набор реагентов выпускается в четырех формах (состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно). Все формы предназначены для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции НК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

Форма выпуска 1 включает смесь для проведения ОТ-ПЦР в пробирке объемом 1,5 или 2 мл для дозирования в любые типы пробирок. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Форма может быть использована как для ручной раскапки, так и совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Форма выпуска 2 включает смесь для проведения ОТ-ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по стрипованным (12,5 стрипов по 8 пробирок) пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Форма выпуска 3 включает смесь для проведения ОТ-ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Форма выпуска 4 включает лиофилизированную смесь для проведения ОТ-ПЦР в стрипованных пробирках (12 стрипов по 8 пробирок) объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 96 образцов, включая контроли.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
ПЦР-смесь HIV	0,6	2 пробирки	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер С	0,3	2 пробирки	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.
Реагент TG	0,015	2 пробирки	Буферный раствор, содержащий 1-тиоглицерол. Прозрачная жидкость.
Taq полимераза	0,06	2 пробирки	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза (MMlv)	0,02	2 пробирки	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
ПКО-1 HIV	0,025	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
ПКО-2 HIV	0,025	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
ВКО В	0,6	2 пробирки	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,1	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,3	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь HIV	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана в стрипованные пробирки под парафин белого цвета.
Буфер D	0,6	2 пробирки	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.
Реагент TG	0,015	2 пробирки	Буферный раствор, содержащий 1-тиоглицерол. Прозрачная жидкость.
Taq полимераза	0,06	2 пробирки	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза (MMlv)	0,02	2 пробирки	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
ПКО-1 HIV	0,025	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
ПКО-2 HIV	0,025	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
ВКО В	0,6	2 пробирки	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,1	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,3	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 3			
ПЦР-смесь HIV	0,01	100 пробирок	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана под парафин.
Буфер D	0,6	2 пробирки	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.

[1] Пробирки с голубым парафином не используются.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Реагент TG	0,015	2 пробирки	Буферный раствор, содержащий 1-тиоглицерол. Прозрачная жидкость.
Taq полимераза	0,06	2 пробирки	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза (MMlv)	0,02	2 пробирки	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
ПКО-1 HIV	0,025	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
ПКО-2 HIV	0,025	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
ВКО В	0,6	2 пробирки	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,1	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,3	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 4			
ПЦР-смесь HIV Lyo	-	96 пробирок (12 стрипов по 8 пробирок)	Лиофилизированная ПЦР-смесь, содержащая специфические праймеры, флуоресцентно-меченые зонды, дНТФ, ионы двухвалентного магния, урацил-ДНК-гликозилазу, термостабильную ДНК-полимеразу Taq, декстран, трегалозу. Лиофилизат белого цвета.
ПКО-1 HIV Lyo	-	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Лиофилизат белого цвета.
ПКО-2 HIV Lyo	-	4 пробирки	Положительный контрольный образец, калибратор. Лиофилизат белого цвета.
ВКО В Lyo	-	2 пробирки	Внутренний контрольный образец. Лиофилизат белого цвета.
ОКО	1,1	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Разбавитель	1,2	2 пробирки	Раствор для восстановления ПКО-1 HIV Lyo, ПКО-2 HIV Lyo, ВКО В Lyo. Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1, 2, 3 или 4)	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде[2] на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-

[2] Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на проведении обратной транскрипции (синтезе молекулы кДНК по молекуле РНК с использованием фермента ревертазы) и последующей амплификации фрагментов кДНК вируса иммунодефицита человека первого типа и внутреннего контрольного образца (ВКО) при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Количественное определение РНК вируса иммунодефицита человека первого типа основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией кДНК-мишени, полученной в ходе обратной транскрипции, в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). При проведении количественного теста обратная транскрипция и амплификация РНК исследуемых образцов проводится одновременно с калибраторами ПКО-1 HIV (или ПКО-1 HIV Lyo) и ПКО-2 HIV (или ПКО-2 HIV Lyo) – образцами с известной концентрацией РНК HIV-1. По результатам проводится расчет концентрации относительно каждого калибратора, с учетом потерь, которые отслеживаются по смещению Ct для ВКО. Концентрация калибраторов измерена относительно Международного стандарта ВОЗ для количественного определения вируса иммунодефицита человека первого типа.

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке амплифицируются участки кДНК вируса иммунодефицита человека первого типа (HIV-1) и искусственно синтезированная последовательность ВКО. Результаты амплификации регистрируются по двум различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие НК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G[3]
НК-мишень	ВКО (экзогенный ВКО)	РНК HIV-1
Область амплификации	Искусственно синтезированная последовательность	5’ LTR, pol

[3] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2.3. Прослеживаемость значений калибраторов

Измерение значений концентрации калибраторов ПКО-1 HIV (или ПКО-1 HIV Lyo) и ПКО-2 HIV (или ПКО-2 HIV Lyo) производится относительно рабочих калибраторов производства ООО «НекстБио». Концентрацию рабочих калибраторов определяют стандартизированной методикой прямого измерения концентрации контрольных образцов на основе генно-модифицированных конструкций с использованием спектрофотометра. Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибраторов составляет не более 5% (с уровнем доверительной вероятности 95%).

Концентрация рабочих положительных контролей измерена относительно Международного стандарта ВОЗ для HIV-1 (NIBSC code 16/194). Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибраторов составляет не более 5% (с уровнем доверительной вероятности 95%). Концентрация новых серий положительных контролей производится относительно рабочих контролей (каждая серия) и относительно стандарта ВОЗ (одна из 10-ти серий).

2.4. Техническое обслуживание и ремонт

Набор не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1. Внутренний контроль качества

3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции РНК и оценки влияния ингибиторов ОТ-ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО – искусственной РНК-содержащей конструкции, которая вносится в каждый исследуемый образец биоматериала, отрицательный контрольный образец этапа экстракции и положительные контрольные образцы. Результаты исследования образцов должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если результаты тестирования исследуемых образцов, полученные для ВКО, не соответствуют заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов», то результаты исследования данных образцов считаются невалидными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться РНК HIV-1. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена РНК HIV-1, и отрицательного контроля, начиная с этапа экстракции.

Отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-) тестируется, начиная с этапа ОТ-ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем ОТ-ПЦР не должна детектироваться РНК HIV-1 или ВКО. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех образцов, начиная с этапа ОТ-ПЦР.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В качестве положительного контроля используются реагенты ПКО-1 HIV (или ПКО-1 HIV Lyo) и ПКО-2 HIV (или ПКО-2 HIV Lyo), входящие в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ОТ-ПЦР.

3.1.2. Анализ калибровки

Количественная оценка концентрации РНК HIV-1 в исследуемых образцах проводится относительно количественно охарактеризованных калибровочных образцов ПКО-1 HIV (или ПКО-1 HIV Lyo) и ПКО-2 HIV (или ПКО-2 HIV Lyo). Положительные контрольные образцы представляют собой модифицированный бактериофаг MS2 с известной концентрацией РНК HIV-1. Исследование калибровочных образцов проводится параллельно с исследованием образцов, начиная с этапа экстракции.

Определение концентрации РНК HIV-1 проводится в соответствии с заданными значениями концентраций калибровочных образцов и полученными значениями порогового цикла (Ct) для калибровочных образцов и исследуемых образцов. Эффективность калибровки должна укладываться в заданный диапазон. Если результаты, полученные для положительных контрольных образцов, не соответствуют заданным, необходимо повторить исследование, начиная с этапа экстракции.

3.1.3. Контроль ингибирования

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции РНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО (реагент ВКО В), который добавляется в каждый исследуемый и контрольные образцы на этапе экстракции. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности для положительных и отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах не обнаружена последовательность ВКО, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции.

3.1.4. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09. Также для предотвращения контаминации лаборатории или в качестве мер по деконтаминации рабочих зон рекомендуется использовать раствор для дезактивации нуклеиновых кислот, например, «Олигатор» производства ООО «НекстБио», Россия.

3.2. Рекомендуемые контрольные материалы

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по обнаружению РНК HIV-1.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора возможно ПЦР-исследование только проб РНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – ВКО В. Без использования ВКО В невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. Набор предназначен для профессионального применения. Набор должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

4.6. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

4.7. Применять набор реагентов строго по назначению согласно инструкции по применению.

4.8. Не применять набор при нарушении целостности упаковки и с истекшим сроком годности.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением требований СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и 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». В соответствии с п. 4.4. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» допускается проведение исследований биологического материала (без предварительного накопления возбудителя) на наличие ДНК (РНК) возбудителей ВИЧ-инфекции в лаборатории, имеющей санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями III-IV группы патогенности. Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.2569-09.

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку[4], биологический материал[5], включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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

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

- Набор предназначен для однократного применения для проведения исследования указанного количества образцов (см. раздел «Формы выпуска, состав и комплектность»).

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21).

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не смешивать реагенты разных серий.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора (кроме Taq полимеразы, Реагента TG и Разбавителя) содержат натрия азид в концентрации не более 0,1 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности, кроме указанных в данном разделе.

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

[5] Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Реагент TG содержит 1-тиоглицерол в концентрации не более 1 % и соответственно не классифицируется как опасный и не требует соблюдения специальных мер предосторожности, кроме указанных в данном разделе.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

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

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие и предварительная обработка исследуемого материала

Взятие и предварительную обработку исследуемого материала проводить согласно МУ 1.3.2569-09.

6.2. Экстракция РНК из исследуемых образцов

6.2.1. Набор реагентов для экстракции нуклеиновых кислот, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять НК из биологического материала (плазма крови) для последующего исследования методом ОТ-ПЦР;
- набор не относится к экспресс-методам экстракции НК;
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной НК в объеме не менее 50 мкл.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли «МагноПрайм® Ультра» (РУ № РЗН 2023/19437) и «АмплиПрайм РИБО-преп» (РУ № ФСР 2012/14017).

6.2.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции НК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции НК.

6.3. Обратная транскрипция, амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.3.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз/РНКаз, следующих видов (при использовании формы выпуска 1):

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора роторного типа.

6.3.2. Завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 - 2 мл – для приготовления реакционной смеси (при использовании формы выпуска 1, 2 или 3).

6.3.3. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6.3.4. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.3.5. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.3.6. Центрифуга-вортекс.

6.3.7. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.3.8. Станция автоматическая с модулем для приготовления и раскапки реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - при использовании формы выпуска 1 в случае приготовления реакционной смеси с использованием автоматической станции.

6.3.9. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного типа, либо планшетного типа, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM и R6G со следующими характеристиками:

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100 °С;
- точность поддержания температуры ≤ ±0,4 °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»: Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399), ДТпрайм (РУ № ФСР 2011/10229).

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

6.3.11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.3.12. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служит плазма крови.

Взятие, предварительную обработку, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории[6]:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75 %.

8.1. Экстракция РНК из исследуемого материала

Для экстракции РНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции НК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции НК.

8.1.1. При использовании форм выпуска 1, 2, 3

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОКО) и положительных контрольных образцов (ПКО-1 HIV и ПКО-2 HIV) в указанном числе повторов:

- ОКО – в одном повторе;
- ПКО-1 HIV – в двух повторах при первой постановке используемой серии набора, в одном – при последующих (только при постановке в количественном формате);
- ПКО-2 HIV – в двух повторах при первой постановке в количественном формате, в одном – при последующих постановках в количественном формате и при постановке в качественном формате.

ВНИМАНИЕ! Калибратор **ПКО-1 HIV** используется только при проведении количественного анализа.

Перед экстракцией необходимо разморозить контрольные образцы: ВКО В, ОКО, ПКО-1 HIV и ПКО-2 HIV.

ВНИМАНИЕ! Размораживать следует только необходимое количество пробирок с реагентами. Для одной постановки ОТ-ПЦР требуется разморозка не более одной пробирки с ПКО-1 HIV и ПКО-2 HIV.

В процессе экстракции РНК использовать объемы реагентов и исследуемых образцов согласно таблице 5.

ВНИМАНИЕ! Реагент ВКО В вносится в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами (включая положительные и отрицательный контроли).

ВНИМАНИЕ! Для экстракции РНК из 100 мкл исследуемого образца используется комплект «АмплиПрайм РИБО-преп», из 200 мкл – «МагноПрайм® Ультра», форма выпуска 1, из 1000 мкл – «МагноПрайм® Ультра», форма выпуска 2 или другие рекомендуемые наборы (см. п. 6.2).

[6] Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 5

Объемы реагентов и исследуемых образцов при использовании форм выпуска 1, 2, 3

Реагент / образец	Объем	Добавлять
При экстракции из 100 мкл образца		
Исследуемый образец	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО
ПКО-1 HIV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК1
ПКО-2 HIV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК2
Реагент, используемый для элюции РНК	50[7] мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 200 мкл образца		
Исследуемый образец	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОКО
ПКО-1 HIV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК1
ПКО-2 HIV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК2
Реагент, используемый для элюции РНК	100 мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 1000 мкл образца		
Исследуемый образец	1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	1000 мкл	в пробирку для ОКО
ПКО-1 HIV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК1
ПКО-2 HIV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК2
Реагент, используемый для элюции РНК	100 мкл	в каждую пробирку

8.1.2. При использовании формы выпуска 4

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОКО) и положительных контрольных образцов (ПКО-1 HIV Lyo и ПКО-2 HIV Lyo) в указанном числе повторов:

- ОКО – в одном повторе;
- ПКО-1 HIV Lyo – в двух повторах при первой постановке используемой серии набора, в одном – при последующих (только при постановке в количественном формате);
- ПКО-2 HIV Lyo – в двух повторах при первой постановке в количественном формате, в одном – при последующих постановках в количественном формате и при постановке в качественном формате.

ВНИМАНИЕ! Калибратор **ПКО-1 HIV Lyo** используется только при проведении количественного анализа.

ВНИМАНИЕ! Реагенты ПКО-1 HIV Lyo, ПКО-2 HIV Lyo и ВКО В Lyo требуют восстановления.

[7] При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для восстановления лиофилизированных реагентов необходимо в пробирку с лиофилизатом добавить **Разбавитель** в объеме, указанном в таблице 6, перемешать содержимое пробирок с восстановленными реагентами, осадить капли на вортексе.

Таблица 6

Объем Разбавителя для восстановления реагентов

Реагент	Разбавитель, мкл
ПКО-1 HIV Lyo	25
ПКО-2 HIV Lyo	25
ВКО В Lyo	600

В процессе экстракции РНК использовать объемы реагентов и исследуемых образцов согласно таблице 7.

ВНИМАНИЕ! Реагент ВКО В Lyo вносится в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами (включая положительные и отрицательный контроли).

ВНИМАНИЕ! Для экстракции РНК из 100 мкл исследуемого образца используется комплект «АмплиПрайм РИБО-преп», из 200 мкл – «МагноПрайм® Ультра», форма выпуска 1, из 1000 мкл – «МагноПрайм® Ультра», форма выпуска 2 или другие рекомендуемые наборы (см. п. 6.2).

Таблица 7

Объемы реагентов и исследуемых образцов при использовании формы выпуска 4

Реагент / образец	Объем	Добавлять
При экстракции из 100 мкл образца		
Исследуемый образец	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В Lyo (восстановленный)	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО
ПКО-1 HIV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК1
ПКО-2 HIV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК2
Реагент, используемый для элюции РНК	50[8] мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 200 мкл образца		
Исследуемый образец	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В Lyo (восстановленный)	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОКО
ПКО-1 HIV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК1
ПКО-2 HIV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК2
Реагент, используемый для элюции РНК	100 мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 1000 мкл образца		
Исследуемый образец	1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В Lyo (восстановленный)	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	1000 мкл	в пробирку для ОКО
ПКО-1 HIV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК1
ПКО-2 HIV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК2
Реагент, используемый для элюции РНК	100 мкл	в каждую пробирку

[8] При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР

8.2.1. При использовании формы выпуска 1

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

ВНИМАНИЕ! Необходимо минимизировать время нахождения Реагента TG, Taq полимеразы и Ревертазы (MMlv) при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.1.1. Рассчитать объемы реагентов, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 8). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 8

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь HIV	**10***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Буфер С	**5***(N+1)	
Реагент TG	**0,25***(N+1)	
Taq полимераза	**1***(N+1)	
Ревертаза (MMlv)	**0,25***(N+1)	

8.2.1.2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами, осадить капли на вортексе.

8.2.1.3. Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.1.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.1.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной **реакционной смеси**.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.2.2. При использовании форм выпуска 2 и 3

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

ВНИМАНИЕ! Необходимо минимизировать время нахождения Реагента TG, Taq полимеразы и Ревертазы (MMlv) при комнатной температуре.

8.2.2.1. Рассчитать объемы реагентов, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 9). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 9

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
Буфер D	**10***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Реагент TG	**0,25***(N+1)	
Taq полимераза	**1***(N+1)	
Ревертаза (MMlv)	**0,25***(N+1)	

8.2.2.2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами, осадить капли на вортексе.

8.2.2.3. Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.2.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов с **ПЦР-смесью HIV** для проведения ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов.

8.2.2.5. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

8.2.2.6. На поверхность парафина внести по **10 мкл** приготовленной **реакционной смеси**, при этом она не должна проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.2.3. При использовании формы выпуска 4

Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью HIV Lyo** для проведения ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов.

8.3. Внесение проб РНК, проведение ОТ-ПЦР и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб НК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе (качественный формат) программирование и запуск амплификатора проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору. При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью/лиофилизатом пробы РНК, полученные в результате экстракции из тестируемых и контрольных образцов, и отрицательный контроль ОТ-ПЦР – реагент **К-** или **Разбавитель** в соответствии с таблицей 10.

Таблица 10

Образцы и их объемы для проведения амплификации

Объем тестируемого образца, мкл	Контрольный образец	Объем контрольного образца, мкл
При использовании форм выпуска 1, 2, 3		
10	ПКО-1 HIV (только при количественном анализе)	10
	ПКО-2 HIV (при качественном или количественном анализе)	
	ОКО	
	К-	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Объем тестируемого образца, мкл	Контрольный образец	Объем контрольного образца, мкл
При использовании формы выпуска 4		
20	ПКО-1 HIV Lyo (только при количественном анализе)	20
	ПКО-2 HIV Lyo (при качественном или количественном анализе)	
	ОКО	
	Разбавитель	

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после внесения НК-проб и контролей в реакционные смеси.

8.3.2. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 11).

Таблица 11

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G	

8.3.3. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.6. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.4. Анализ и вычисление результатов

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! Количественный анализ результатов возможно проводить только в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы НК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора (см. вкладыш к набору и инструкцию по применению амплификатора).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по двум каналам детекции (см. таблицу 12).

Таблица 12

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G
Продукт амплификации	ВКО	РНК HIV-1

При количественном анализе расчет концентрации выполняется в двух вариантах:

- в копиях РНК возбудителя на 1 мл образца;
- в логарифмах копий РНК возбудителя на 1 мл образца.

Расчет концентрации РНК HIV-1 проводится по формуле:

$$\mathbf{C_{обр} = Коэффициент\ А \times ((C_{обр\text{-}1} + C_{обр\text{-}2}) / 2),}$$

$$\mathbf{Коэффициент\ А = 100 / объем\ экстракции\ (мкл),}$$

$$\mathbf{C_{обр\text{-}1} = C_{пк1}/2\text{^} ((Ct_{обр.\ спец} - Ct_{пк1\ спец}) - (Ct_{обр.\ вко} - Ct_{пк1\ вко})),}$$

$$\mathbf{C_{обр\text{-}2} = C_{пк2}/2\text{^} ((Ct_{обр.\ спец} - Ct_{пк2\ спец}) - (Ct_{обр.\ вко} - Ct_{пк2\ вко})),}$$

где:

$\mathbf{C_{обр}}$ – расчетное значение концентрации РНК HIV-1 (копий/мл) для каждого тестируемого образца;

$\mathbf{C_{обр\text{-}1}}$ – расчетное значение концентрации РНК HIV-1 (копий/мл) для каждого тестируемого образца, рассчитанное с учетом значений, полученных для ПК1;

$\mathbf{C_{обр\text{-}2}}$ – расчетное значение концентрации РНК HIV-1 (копий/мл) для каждого тестируемого образца, рассчитанное с учетом значений, полученных для ПК2;

$\mathbf{C_{пк1}}$ – концентрация ПК1 (копий/мл), указана во вкладыше к набору реагентов для калибратора ПКО-1 HIV / ПКО-1 HIV Lyo;

$\mathbf{C_{пк2}}$ – концентрация ПК2 (копий/мл), указана во вкладыше к набору реагентов для калибратора ПКО-2 HIV / ПКО-2 HIV Lyo;

$\mathbf{Ct_{обр.\ спец}}$ – значение Ct для тестируемого образца по каналу R6G;

$\mathbf{Ct_{пк1\ спец}}$[9] – значение Ct для образца ПК1 по каналу R6G;

$\mathbf{Ct_{пк2\ спец}}$[9] – значение Ct для образца ПК2 по каналу R6G;

$\mathbf{Ct_{обр.\ вко}}$ – значение Ct для тестируемого образца по каналу FAM;

$\mathbf{Ct_{пк1\ вко}}$[9] – значение Ct для образца ПК1 по каналу FAM;

$\mathbf{Ct_{пк2\ вко}}$[9] – значение Ct для образца ПК2 по каналу FAM.

Для получения результатов в Lg X копий/мл необходимо воспользоваться функцией LOG в программе Microsoft Excel.

Для получения значения концентрации в МЕ/мл, необходимо значение, полученное в копиях/мл, умножить на 1 (1 копия = 1 МЕ).

[9] При первой постановке серии набора для расчета используется среднее значение Ct, полученное для двух повторов калибраторов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- в качественном формате вручную в соответствии с таблицей 13 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 15;

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 14 и 15 соответственно.

Таблица 13

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении качественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM** и **R6G не определено или определено выше граничного**[10]	**Невалидный!** Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного**, а по каналу для флуорофора **R6G выше граничного**	**Результат сомнительный**
Значение Ct по каналу для флуорофора **R6G не определено**, а по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного**	**РНК HIV-1 не обнаружена**
Значение Ct по каналу для флуорофора **R6G определено не выше граничного.** При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.	**РНК HIV-1 обнаружена**

[10] Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 14

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM** и **R6G не определено или определено выше граничного**[11]	**Невалидный!** Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора **R6G не определено**, а по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного**	**РНК HIV-1 не обнаружена**
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM не определено или определено выше граничного,** а по каналу для флуорофора **R6G определено не выше граничного**	**Обнаружена РНК HIV-1. Количественный расчет невозможен**
Рассчитанное значение концентрации РНК по каналу для флуорофора **R6G меньше нижнего предела линейного диапазона измерения** набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного**	**РНК HIV-1 обнаружена в концентрации менее 1×10^3 копий/мл** при экстракции из 100 мкл образца
	РНК HIV-1 обнаружена в концентрации менее 5×10^2 копий/мл при экстракции из 200 мкл образца
	РНК HIV-1 обнаружена в концентрации менее 1×10^2 копий/мл при экстракции из 1000 мкл образца
Рассчитанное значение концентрации РНК по каналу для флуорофора **R6G** находится **в пределах линейного диапазона измерения** набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного**	**РНК HIV-1 обнаружена в концентрации $X\times10^y$ копий/мл или Lg X копий/мл**
Рассчитанное значение концентрации РНК по каналу для флуорофора **R6G выше верхнего предела линейного диапазона измерения** набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного**	**РНК HIV-1 обнаружена в концентрации более 1×10^8 копий/мл**

Таблица 15

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора	
	FAM	**R6G**
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Определено значение Ct не выше граничного[11]	Значение Ct отсутствует
К- (отрицательный контроль ОТ-ПЦР)	Значение Ct отсутствует	
ПК2	Определено значение Ct не выше граничного	
ПК1 ПК2	-	Показатель эффективности амплификации (E) для калибраторов укладывается в диапазон 0,8 – 1,2[12]; Коэффициент детерминации (R^2) не менее 0,99[12, 13]

[11] Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

[12] Данные критерии учитываются только при постановке в количественном формате.

[13] Коэффициент детерминации (R^2) учитывается при первой постановке используемой серии набора.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению

8.6.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналу для флуорофора R6G определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех образцов, в которых обнаружена РНК выявляемого вируса, начиная с этапа экстракции НК.

8.6.2. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналу для флуорофора FAM и/или R6G/HEX/JOE/VIC определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех образцов, в которых обнаружена РНК выявляемого вируса, начиная с этапа амплификации НК.

8.6.3. Если показатель эффективности Е при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %, необходимо проверить правильность заданных значений концентраций калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить исследование, начиная с этапа ОТ-ПЦР.

8.6.4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.6.5. В случае получения невалидных или сомнительных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции НК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести взятие, предварительную подготовку и исследование образца.

8.7. Диагностическое значение полученного результата

ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента. Результаты, полученные при использовании набора, следует рассматривать и интерпретировать в сочетании с данными других клинических и лабораторных исследований.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения[14]

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® HIV» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 16).

Значения характеристики, указанные в таблице 16, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 16

Предел обнаружения набора

Объем биоматериала при экстракции, мкл	Предел обнаружения по Probit 95%, копий/мл	95%-ый доверительный интервал, копий/мл
100	200	179 – 226
200	100	89,3 – 114
1000	20	17,9 – 22,9

9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Диапазон, в котором набор дает линейный ответ, приведен в таблице 17. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора. Указанные значения характеристики достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 17

Линейный диапазон измерения набора

Объем биоматериала при экстракции, мкл	Линейный диапазон измерения, копий/мл
100	$1\times10^3 – 1\times10^8$
200	$5\times10^2 – 1\times10^8$
1000	$1\times10^2 – 1\times10^8$

9.3. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает только фрагменты РНК HIV-1, специфичен по отношению к различным субтипам РНК вируса HIV-1 группы M (A, B, C, D, AE, F, G, AG-GH), группе N и группе O.

Аналитическая специфичность набора «АмплиПрайм® HIV» оценивалась тестированием НК микроорганизмов и вирусов, приведенных в таблице 18, в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл и геномной ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл, а также тестированием различных субтипов РНК вируса HIV-1 (см. таблицу 18) с использованием 2-ой Международной контрольной панели ВОЗ препарата субтипа ВИЧ-1 для NAT. Код NIBSC: 12/224 (2nd WHO International Reference Panel Preparation for HIV-1 Subtypes for NAT (Main) NIBSC code: 12/224) в концентрации не менее 1×10^5 копий/мл.

[14] Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация РНК выявляемого возбудителя, при которой 95% тестов дают положительный результат).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 18

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
Hepatitis B virus (HBV)	*Herpes simplex virus* I (HSV I)
Hepatitis C virus (HCV)	*Herpes simplex virus* II (HSV II)
Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2)	*Staphylococcus aureus*
Epstein-Barr virus (EBV)	*Streptococcus pyogenes*
Cytomegalovirus (CMV)	*Streptococcus agalactiae*
Human herpesvirus 6 (HHV6)	*Pseudomonas aeruginosa*
Varicella Zoster virus (VZV)	*Escherichia coli*
Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype A	*Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1) subtype F
Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype B	*Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1) subtype G
Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype C	*Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1) subtype AG-GH
Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype D	*Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1) group N
Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype AE	*Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1) group O

При тестировании набора «АмплиПрайм® HIV» была доказана специфичность к различным субтипам РНК вируса HIV-1 (группа M (A, B, C, D, AE, F, G, AG-GH), группа N и группа O) и отсутствие перекрестных реакций к геномной ДНК человека, микроорганизмам и вирусам, не заявленных к определению исследуемым набором реагентов.

9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость результатов с использованием набора реагентов оценивали путем тестирования модельных образцов. Модельные образцы были приготовлены путем контаминации образцов плазмы крови стандартными образцами предприятия, содержащими искусственно-синтезированную РНК HIV-1. Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию НК, ОТ-ПЦР и детекцию результатов).

При оценке повторяемости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения концентрации РНК HIV-1, не превышал 5 %.

При оценке воспроизводимости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения концентрации РНК HIV-1, не превышал 10 %.

9.5. Правильность измерения

Правильность измерения с использованием набора «АмплиПрайм® HIV» была определена путем тестирования стандартного образца предприятия, содержащего искусственно-синтезированную РНК HIV-1, в 160 повторах (см. таблицу 19).

Таблица 19

Правильность измерения

Среднее значение концентрации РНК HIV-1, log_{10}	Установленное значение концентрации, log_{10}	Систематическая погрешность (B)	
		log_{10}	%
5,66	5,7	0,04	0,7

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® HIV» были использованы 815 образцов плазмы крови.

В качестве наборов сравнения, с помощью которых устанавливали наличие/отсутствие РНК HIV-1 использовались наборы реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT» (РУ № ФСР 2008/02552) и «АмплиСенс® *HCV* / *HBV* / *HIV*-FL» (РУ № ФСР 2009/06187).

Результаты тестирования набора «АмплиПрайм® HIV» в сравнении с наборами сравнения приведены в таблице 20.

Таблица 20

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® HIV»

Исследуемые образцы		Результаты тестирования						
Тип	Коли-чество	Образцы	Тестируемый набор «АмплиПрайм® HIV»				Наборы сравнения	
			Форма выпуска 1	Форма выпуска 2	Форма выпуска 3	Форма выпуска 4	АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT	АмплиСенс® *HCV* / *HBV* / *HIV*-FL
Плазма крови	815	Положи-тельных	285	285	285	285	285	285
		Отрица-тельных	530	530	530	530	530	530

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® HIV» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 21.

Таблица 21

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® HIV»

Тип образцов	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность
Плазма крови	100 % (99,3 % – 100 %)	100 % (98,7 % – 100 %)

9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ОТ-ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® HIV» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 22, в максимально возможной концентрации.

Таблица 22

Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора «АмплиПрайм® HIV»

Интерферент	Концентрация интерферента в образце
гемоглобин	200 мг/мл
иммуноглобулин G	16 мг/мл
лактоферрин	1 мкг/мл
билирубин	0,2 мг/мл
триглицериды	5 мг/мл
альбумин	50 мг/мл
ДНК человека	1×10^8 копий/мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности всех форм выпуска набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать согласно срокам, указанным в п. 10.3. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

10.2.1. Формы выпуска 1, 2, 3

Набор транспортировать при температуре от минус 24 до минус 16 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.2.2. Форма выпуска 4

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 3 суток.

Не допускается замораживание реагентов набора.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

10.3.1. Формы выпуска 1, 2, 3

Набор хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.

Контрольные образцы (ПКО-1 HIV, ПКО-2 HIV, ВКО В и ОКО) после разморозки хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 6 месяцев. Не допускается повторная заморозка контрольных образцов. Остальные реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Необходимо минимизировать время нахождения Реагента TG, Taq полимеразы и Ревертазы (MMlv) при комнатной температуре.

Реакционная смесь, приготовленная из реагентов, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

10.3.2. Форма выпуска 4

Набор беречь от влаги. Хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора. ПЦР-смесь HIV Lyo хранить в пакете с силикагелем.

Восстановленные контрольные образцы (ПКО-1 HIV Lyo, ПКО-2 HIV Lyo, ВКО В Lyo) хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Упаковку с лиофилизированными реагентами (ПКО-1 HIV Lyo, ПКО-2 HIV Lyo, ВКО В Lyo) необходимо вскрывать непосредственно перед их восстановлением.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты (за исключением восстановленных) стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Не допускается замораживание реагентов набора.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® HIV» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

При выявлении нежелательных реакций при использовании набора, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в Российской Федерации – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Не допускать попадания солнечного света
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		Беречь от влаги

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Пронумеровано, скреплено и прошито
30 лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«НекстБио»

_____ М.Е. Сенина



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НекстБио»

_____ М. Е. Сенина

09.06.2023

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА ПЕРВОГО ТИПА (HIV-1) МЕТОДОМ ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» «АМПЛИПРАЙМ® HIV» ПО ТУ 21.20.23-211-09286667-2023

Форма выпуска 1

Форма выпуска 2

Форма выпуска 3

Форма выпуска 4

Краткое руководство по применению версии 09.06.23-1

Лист утверждения

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека первого типа (HIV-1) методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® HIV» по ТУ 21.20.23-211-09286667-2023

АмплиПрайм® HIV

Форма выпуска 1

2165-41

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ плазма крови

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь HIV	Прозрачная жидкость	0,6	2 пробирки
Буфер С	Прозрачная жидкость	0,3	2 пробирки
Реагент TG	Прозрачная жидкость	0,015	2 пробирки
Taq полимераза	Прозрачная жидкость	0,06	2 пробирки
Ревертаза (MMlv)	Прозрачная жидкость	0,02	2 пробирки
ПКО-1 HIV	Прозрачная жидкость	0,025	4 пробирки
ПКО-2 HIV	Прозрачная жидкость	0,025	4 пробирки
ВКО В	Прозрачная жидкость	0,6	2 пробирки
ОКО	Прозрачная жидкость	1,1	2 пробирки
К-	Прозрачная жидкость	0,3	2 пробирки
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 1
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
Набор хранить при температуре от – 24 до – 16 °С в защищенном от света месте. Необходимо минимизировать время нахождения Реагента TG, Taq полимеразы и Ревертазы (MMlv) при комнатной температуре. Контрольные образцы (ПКО-1 HIV, ПКО-2 HIV, ВКО В и ОКО) после разморозки хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 6 месяцев. Не допускается повторная заморозка контрольных образцов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции РНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® HIV». Порядок работы с наборами для экстракции НК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! Для экстракции из 100 мкл исследуемого образца используется комплект «АмплиПрайм РИБО-преп», из 200 или 1000 мкл – «МагноПрайм® Ультра» или другие наборы, рекомендуемые в инструкции по применению набора.

ВНИМАНИЕ! Калибратор **ПКО-1 HIV** используется только при проведении количественного анализа: в двух повторах при первой постановке используемой серии набора, в одном – при последующих. Калибратор **ПКО-2 HIV** используется в двух повторах при первой постановке в количественном формате, в одном – при последующих постановках в количественном формате и при постановке в качественном формате.

ВНИМАНИЕ! Реагент ВКО В вносится в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами (включая положительные (ПКО-1 HIV, ПКО-2 HIV) и отрицательный (ОКО) контроли).

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции РНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
При экстракции из 100 мкл образца		
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HIV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HIV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции РНК	50[1] мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 200 мкл образца		
Исследуемые образцы	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HIV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HIV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции РНК	100 мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 1000 мкл образца		
Исследуемые образцы	1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	1000 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HIV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HIV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции РНК	100 мкл	в каждую пробирку

[1] При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

1. Рассчитать объемы реагентов, необходимые для приготовления реакционной смеси, согласно таблице:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь HIV	**10***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Буфер С	**5***(N+1)	
Реагент TG	**0,25***(N+1)	
Taq полимераза	**1***(N+1)	
Ревертаза (MMlv)	**0,25***(N+1)	

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

ВНИМАНИЕ! Необходимо минимизировать время нахождения Реагента TG, Taq полимеразы и Ревертазы (MMlv) при комнатной температуре.

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами, осадить капли на вортексе.

3. Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

5. Внести в подготовленные пробирки реакционную смесь и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в пробирки для исследуемых и контрольных образцов
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы РНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К–	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ОТ-ПЦР)
Пробы, экстрагированной из ПКО-1 HIV *(только при количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК1 (положительного контроля)
Пробы, экстрагированной из ПКО-2 HIV *(при качественном или количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК2 (положительного контроля)

6. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[2]	

Примечание - Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

7. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
8. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.
9. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;

- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

[2] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека первого типа (HIV-1) методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® HIV» по ТУ 21.20.23-211-09286667-2023

АмплиПрайм® HIV

Форма выпуска 2

P2165-42

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ плазма крови

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь HIV	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин белого цвета	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]
Буфер D	Прозрачная жидкость	0,6	2 пробирки
Реагент TG	Прозрачная жидкость	0,015	2 пробирки
Taq полимераза	Прозрачная жидкость	0,06	2 пробирки
Ревертаза (MMlv)	Прозрачная жидкость	0,02	2 пробирки
ПКО-1 HIV	Прозрачная жидкость	0,025	4 пробирки
ПКО-2 HIV	Прозрачная жидкость	0,025	4 пробирки
ВКО В	Прозрачная жидкость	0,6	2 пробирки
ОКО	Прозрачная жидкость	1,1	2 пробирки
К-	Прозрачная жидкость	0,3	2 пробирки
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 2
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
Набор хранить при температуре от – 24 до – 16 °С в защищенном от света месте. Необходимо минимизировать время нахождения Реагента TG, Taq полимеразы и Ревертазы (MMlv) при комнатной температуре. Контрольные образцы (ПКО-1 HIV, ПКО-2 HIV, ВКО В и ОКО) после разморозки хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 6 месяцев. Не допускается повторная заморозка контрольных образцов.

[1] Пробирки с голубым парафином не используются.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции РНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® HIV». Порядок работы с наборами для экстракции НК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! Для экстракции из 100 мкл исследуемого образца используется комплект «АмплиПрайм РИБО-преп», из 200 или 1000 мкл – «МагноПрайм® Ультра» или другие наборы, рекомендуемые в инструкции по применению набора.

ВНИМАНИЕ! Калибратор **ПКО-1 HIV** используется только при проведении количественного анализа: в двух повторах при первой постановке используемой серии набора, в одном – при последующих. Калибратор **ПКО-2 HIV** используется в двух повторах при первой постановке в количественном формате, в одном – при последующих постановках в количественном формате и при постановке в качественном формате.

ВНИМАНИЕ! Реагент ВКО В вносится в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами (включая положительные (ПКО-1 HIV, ПКО-2 HIV) и отрицательный (ОКО) контроли).

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции РНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
При экстракции из 100 мкл образца		
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HIV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HIV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции РНК	50[2] мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 200 мкл образца		
Исследуемые образцы	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HIV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HIV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции РНК	100 мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 1000 мкл образца		
Исследуемые образцы	1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	1000 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HIV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HIV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции РНК	100 мкл	в каждую пробирку

[2] При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

1. Рассчитать объемы реагентов, необходимые для приготовления реакционной смеси, согласно таблице:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
Буфер D	**10***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Реагент TG	**0,25***(N+1)	
Taq полимераза	**1***(N+1)	
Ревертаза (MMlv)	**0,25***(N+1)	

ВНИМАНИЕ! Необходимо минимизировать время нахождения Реагента TG, Taq полимеразы и Ревертазы (MMlv) при комнатной температуре.

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами, осадить капли на вортексе.

3. Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью HIV** для проведения ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов.

5. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

6. Внести в подготовленные пробирки реакционную смесь и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 10 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в пробирки с ПЦР-смесью HIV на поверхность парафина **ВНИМАНИЕ!** Реакционная смесь не должна проваливаться под парафин.
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы РНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К–	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ОТ-ПЦР)
Пробы, экстрагированной из ПКО-1 HIV *(только при количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК1 (положительного контроля)
Пробы, экстрагированной из ПКО-2 HIV *(при качественном или количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК2 (положительного контроля)

7. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[3]	

Примечание - Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

8. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

9. Установить стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

10. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;

- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

[3] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека первого типа (HIV-1) методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® HIV» по ТУ 21.20.23-211-09286667-2023

АмплиПрайм® HIV

Форма выпуска 3

P2165-43

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ плазма крови

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь HIV	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин	0,01	100 пробирок
Буфер D	Прозрачная жидкость	0,6	2 пробирки
Реагент TG	Прозрачная жидкость	0,015	2 пробирки
Taq полимераза	Прозрачная жидкость	0,06	2 пробирки
Ревертаза (MMlv)	Прозрачная жидкость	0,02	2 пробирки
ПКО-1 HIV	Прозрачная жидкость	0,025	4 пробирки
ПКО-2 HIV	Прозрачная жидкость	0,025	4 пробирки
ВКО В	Прозрачная жидкость	0,6	2 пробирки
ОКО	Прозрачная жидкость	1,1	2 пробирки
К-	Прозрачная жидкость	0,3	2 пробирки
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 3
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
Набор хранить при температуре от – 24 до – 16 °С в защищенном от света месте. Необходимо минимизировать время нахождения Реагента TG, Taq полимеразы и Ревертазы (MMlv) при комнатной температуре. Контрольные образцы (ПКО-1 HIV, ПКО-2 HIV, ВКО В и ОКО) после разморозки хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 6 месяцев. Не допускается повторная заморозка контрольных образцов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции РНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® HIV». Порядок работы с наборами для экстракции НК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! Для экстракции из 100 мкл исследуемого образца используется комплект «АмплиПрайм РИБО-преп», из 200 или 1000 мкл – «МагноПрайм® Ультра» или другие наборы, рекомендуемые в инструкции по применению набора.

ВНИМАНИЕ! Калибратор **ПКО-1 HIV** используется только при проведении количественного анализа: в двух повторах при первой постановке используемой серии набора, в одном – при последующих. Калибратор **ПКО-2 HIV** используется в двух повторах при первой постановке в количественном формате, в одном – при последующих постановках в количественном формате и при постановке в качественном формате.

ВНИМАНИЕ! Реагент ВКО В вносится в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами (включая положительные (ПКО-1 HIV, ПКО-2 HIV) и отрицательный (ОКО) контроли).

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции РНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
При экстракции из 100 мкл образца		
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HIV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HIV	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции РНК	50[1] мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 200 мкл образца		
Исследуемые образцы	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HIV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HIV	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции РНК	100 мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 1000 мкл образца		
Исследуемые образцы	1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО В	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	1000 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HIV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HIV	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции РНК	100 мкл	в каждую пробирку

[1] При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

1. Рассчитать объемы реагентов, необходимые для приготовления реакционной смеси, согласно таблице:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
Буфер D	**10***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Реагент TG	**0,25***(N+1)	
Taq полимераза	**1***(N+1)	
Ревертаза (MMlv)	**0,25***(N+1)	

ВНИМАНИЕ! Необходимо минимизировать время нахождения Реагента TG, Taq полимеразы и Ревертазы (MMlv) при комнатной температуре.

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами, осадить капли на вортексе.

3. Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью HIV** для проведения ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов.

5. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

6. Внести в подготовленные пробирки реакционную смесь и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 10 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в пробирки с ПЦР-смесью HIV на поверхность парафина **ВНИМАНИЕ!** Реакционная смесь не должна проваливаться под парафин.
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы РНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К–	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ОТ-ПЦР)
Пробы, экстрагированной из ПКО-1 HIV *(только при количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК1 (положительного контроля)
Пробы, экстрагированной из ПКО-2 HIV *(при качественном или количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК2 (положительного контроля)

7. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[2]	

Примечание - Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

8. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

9. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

10. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;

- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

[2] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека первого типа (HIV-1) методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® HIV» по ТУ 21.20.23-211-09286667-2023

АмплиПрайм® HIV

Форма выпуска 4

2165-44

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ плазма крови

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь HIV Lyo	Лиофилизат белого цвета	-	96 пробирок (12 стрипов по 8 пробирок)
ПКО-1 HIV Lyo	Лиофилизат белого цвета	-	4 пробирки
ПКО-2 HIV Lyo	Лиофилизат белого цвета	-	4 пробирки
ВКО B Lyo	Лиофилизат белого цвета	-	2 пробирки
ОКО	Прозрачная жидкость	1,1	2 пробирки
Разбавитель	Прозрачная жидкость	1,2	2 пробирки
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 4
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
Набор беречь от влаги. Хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте. Восстановленные контрольные образцы (ПКО-1 HIV Lyo, ПКО-2 HIV Lyo, ВКО B Lyo) хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев. ПЦР-смесь HIV Lyo хранить в пакете с силикагелем. Упаковку с лиофилизированными реагентами необходимо вскрывать непосредственно перед их восстановлением. Не допускается замораживание реагентов набора.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции РНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® HIV». Порядок работы с наборами для экстракции НК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! Для экстракции из 100 мкл исследуемого образца используется комплект «АмплиПрайм РИБО-преп», из 200 или 1000 мкл – «МагноПрайм® Ультра» или другие наборы, рекомендуемые в инструкции по применению набора.

ВНИМАНИЕ! Калибратор **ПКО-1 HIV Lyo** используется только при проведении количественного анализа: в двух повторах при первой постановке используемой серии набора, в одном – при последующих. Калибратор **ПКО-2 HIV Lyo** используется в двух повторах при первой постановке в количественном формате, в одном – при последующих постановках в количественном формате и при постановке в качественном формате.

ВНИМАНИЕ! Реагент ВКО B Lyo вносится в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами (включая положительные (ПКО-1 HIV Lyo, ПКО-2 HIV Lyo) и отрицательный (ОКО) контроли).

ВНИМАНИЕ! Реагенты ПКО-1 HIV Lyo, ПКО-2 HIV Lyo и ВКО B Lyo требуют восстановления.

Для восстановления лиофилизированных реагентов необходимо в пробирку с лиофилизатом добавить Разбавитель в объеме, указанном в таблице ниже.

Реагент	Разбавитель, мкл
ПКО-1 HIV Lyo	25
ПКО-2 HIV Lyo	25
ВКО B Lyo	600

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции РНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
При экстракции из 100 мкл образца		
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО B Lyo (восстановленный)	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HIV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HIV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 90 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции РНК	50[1] мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 200 мкл образца		
Исследуемые образцы	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО B Lyo (восстановленный)	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HIV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HIV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 190 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции РНК	100 мкл	в каждую пробирку
При экстракции из 1000 мкл образца		
Исследуемые образцы	1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО B Lyo (восстановленный)	10 мкл	в каждую пробирку
ОКО	1000 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля)
ПКО-1 HIV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК1 (положительного контроля)
ПКО-2 HIV Lyo (восстановленный)	10 мкл + 990 мкл ОКО	в пробирку для ПК2 (положительного контроля)
Реагент для элюции РНК	100 мкл	в каждую пробирку

[1] При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью HIV Lyo** для проведения ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов.
2. Внести в пробирки с **ПЦР-смесью HIV Lyo** образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 20 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы РНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Разбавитель	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ОТ-ПЦР)
Пробы, экстрагированной из ПКО-1 HIV Lyo *(только при количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК1 (положительного контроля)
Пробы, экстрагированной из ПКО-2 HIV Lyo *(при качественном или количественном анализе)*	в пробирку для образца ПК2 (положительного контроля)

3. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[2]	

Примечание - Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

4. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
5. Установить стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.
6. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

[2] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;

- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Пронумеровано, скреплено и прошито
17 лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«НекстВью»
_____ М.Е. Сенина



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru