



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления нуклеиновых кислот (НК) вируса иммунодефицита
человека (ВИЧ) методом обратной транскрипции
и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

ВИЧ-ГЕН

Регистрационное удостоверение МЗ СР РФ
ФСР 2008/03504

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления нуклеиновых кислот (НК) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) ВИЧ-ГЕН

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления нуклеиновых кислот (НК) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) методом обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции ВИЧ-ГЕН предназначен для применения в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике для диагностики ВИЧ *in vitro*.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Набор реагентов ВИЧ-ГЕН основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации фрагментов кДНК и провирусной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

Внутренний контрольный образец, представляющий собой стабилизированный фрагмент РНК, добавляется в исследуемый образец на стадии выделения нуклеиновых кислот и предназначен для оценки качества всех этапов исследования.

В наборе ВИЧ-ГЕН в формате с флуоресцентной детекцией в реакционную смесь введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции, в формате с детекцией методом гель-электрофореза ДНК-зонды в реакционной смеси отсутствуют.

В случае образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами.

ДНК-зонды, для искомой ДНК и внутреннего контрольного

образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации нуклеиновых кислот ВИЧ и внутреннего контрольного образца.

Для анализа продуктов ПЦР можно использовать детектирующие амплификаторы, специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы) или метод электрофореза в агарозном геле.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

2.2. Состав набора

Набор состоит из трёх комплектов:

1. Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА–НК) включает:

- лизирующий раствор – 1 флакон (30 мл);
- реагент для преципитации – 1 флакон (40 мл);
- промывочный раствор №1 – 1 флакон (50 мл);
- промывочный раствор №2 – 1 флакон (30 мл);
- буфер для растворения – 4 пробирки (по 1,25 мл);
- отрицательный контрольный образец («К–») – 2 пробирки (по 1,5 мл);
- внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл);
- внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл).

2. Комплект реагентов для обратной транскрипции включает:

- буферный раствор для обратной транскрипции «ОТ-буфер» – 1 пробирка (200 мкл);

- смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) и праймеров для обратной транскрипции «Праймеры ОТ-ВИЧ+дНТФ» – 1 пробирка (100 мкл);
- обратную транскриптазу – 1 пробирка (50 мкл).

3. Комплект реагентов для ПЦР–амплификации включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 100 пробирок (по 20 мкл) для форматов «FLASH» и «Форез», 96 пробирок (по 20 мкл) для формата «Real-time»;
- Taq–полимеразу – 1 пробирка (50 мкл);
- ПЦР–буфер – 2 пробирки (по 500 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- положительный контрольный образец («К+») – 1 пробирка (150 мкл).

Дополнительно, по запросу потребителей возможна поставка **комплекта реагентов для детекции ДНК методом гель–электрофореза**, комплект включает:

- смесь для электрофореза – 1 пакет (16,9 г);
- агарозный гель – 5 пластин.

2.3. Время проведения анализа – 4 часа.

2.4. Набор рассчитан на проведение 96/100 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

В образцах крови человека, содержащих нуклеиновые кислоты вируса иммунодефицита человека, после проведения реакций обратной транскрипции и амплификации, детектор флуоресценции должен регистрировать положительный результат, а детектирующий амплификатор – экспоненциальный рост уровня флуоресценции. При анализе результатов с использованием гель–электрофореза должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома ВИЧ, размером 223 пар

нуклеотидов (п.н.).

В образцах, не содержащих нуклеиновых кислот ВИЧ, результат исследования должен быть отрицательным.

3.2. Чувствительность анализа: 200 копий на 1,0 мл плазмы.

При проведении предварительного ультрацентрифугирования плазмы крови чувствительность анализа составляет 30–50 копий на 1,0 мл плазмы.

3.3. Диагностическая чувствительность: 99,5%.

3.4. Диагностическая специфичность: 100%.

3.5. Выявление субтипов ВИЧ-1:
набор реагентов ВИЧ-ГЕН выявляет все субтипы группы M.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Мерами предосторожности при работе с набором реагентов является соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.2. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609–2000).

4.3. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.4. Работать с набором в одноразовых резиновых перчатках без талька.

4.5. На стадиях приготовления реакционной смеси и обработки образцов крови необходимо использовать только новые наконечники и пробирки.

4.6. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов крови.

4.7. Выделение НК следует проводить в ламинарных шкафах с включённым ламинарным потоком. Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.

4.8. Для предотвращения контаминации, этапы выделения РНК, обратной транскрипции, ПЦР и электрофореза следует

проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабжённых комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

- 4.9.** При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.
- 4.10.** Запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания.
- 4.11.** Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.
- 4.12.** Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после окончания работ в течение 1 часа.
- 4.13.** Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569–09.

При работе с набором реагентов ВИЧ-ГЕН требуются следующие оборудование и материалы:

- обычный или детектирующий амплификатор;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 40–95°C;
- микроцентрифуга/вортекс со скоростью вращения 1000–3000 об/мин;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл,

2,5 мл;

- пипетки автоматические одноканальные с переменным объёмом: 0,5–10 мкл, 5–40 мкл, 40–200 мкл, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для автоматических пипеток с маркировкой «RNase-free, DNase-free» объёмом 1–20 мкл, 1–50 мкл, 1–200 мкл, 100–1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские;
- контейнер с дезинфицирующим раствором.

Для детекции с помощью специализированного детектора флуоресценции:

- специализированный детектор флуоресценции.

Для детекции методом электрофореза требуются:

- источник постоянного тока;
- камера для электрофореза;
- трансиллюминатор;
- колба мерная вместимостью 1,0 л;
- дистиллированная вода;
- стальная проволока диаметром 1,0 мм.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Взятие образцов периферической крови

Взятие крови проводится в пластиковые пробирки объёмом 2,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2–3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.2. Транспортировка и хранение исследуемого материала

ВНИМАНИЕ! Время от взятия материала до получения плазмы не должно превышать 6 часов.

Транспортировать и хранить образцы крови до начала исследования при 2–8°C.

6.3. Получение плазмы с форменными элементами крови без эритроцитов

6.3.1. Пробирки с кровью центрифугировать при 1000 об/мин в течение 1 мин.

6.3.2. После центрифугирования отобрать автоматической пипеткой верхнюю фракцию и перенести в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

Хранить полученную плазму с форменными элементами крови (без эритроцитов) можно при температуре минус 20°C в течение 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение нуклеиновых кислот из биологического материала

Примечание. Перед началом работы достать из холодильника комплект реагентов для выделения НК и проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе. В случае выпадения осадка флакон с лизирующим раствором прогреть при 65°C в течение 10 мин до полного растворения осадка.

Примечание. Для повышения чувствительности анализа необходимо провести предварительное ультрацентрифугирование 1,0 мл плазмы крови при 16500 об/мин (24000 g) в течение 1 часа при 2–8°C.

ВНИМАНИЕ! На данном этапе используйте только наконечники с маркировкой «RNase-free, DNase-free».

7.1.1. Промаркировать необходимое количество новых пластиковых пробирок объёмом 1,5 мл с учётом пробирок для отрицательного контрольного образца «К-».

7.1.2. Внести по 10 мкл внутреннего контрольного образца (РНК-ВК) в каждую пластиковую пробирку.

7.1.3. Добавить по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.

7.1.4. Добавить в пробирки для исследуемых образцов 100 мкл исследуемого образца (плазму с форменными элементами). В пробирку, промаркированную «К-», добавить 100 мкл

отрицательного контрольного образца.

ВНИМАНИЕ! Пробирки с исследуемыми образцами и отрицательным контрольным образцом необходимо обрабатывать по единой схеме.

- 7.1.5. Плотно закрыть крышки пробирок, перемешать на вортексе в течение 3–5 сек.
- 7.1.6. Термостатировать пробирки при 65°C в течение 15 мин, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.
- 7.1.7. Добавить 400 мкл реагента для преципитации, встряхнуть на вортексе в течение 3–5 сек.
- 7.1.8. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин.
- 7.1.9. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 7.1.10. Добавить к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 7.1.11. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.
- 7.1.12. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 7.1.13. Добавить к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 7.1.14. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.
- 7.1.15. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 7.1.16. Открыть крышки пробирок и высушить осадок при 65°C в течение 5 мин.
- 7.1.17. Добавить к осадку 16,5 мкл буфера для растворения, закрыть крышки пробирок и прогреть пробирки при 65°C в течение 10 мин, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.

Примечание. При необходимости постановки анализов на

несколько инфекций из одного и того же образца осадок следует растворить в 50 мкл буфера для растворения.

ВНИМАНИЕ! Увеличение объёма буфера для растворения приводит к пропорциональному разбавлению образца и уменьшению чувствительности анализа.

Чувствительность анализа, равная 200 копий/мл, для комплекта ВИЧ-ГЕН определена при растворении осадка в 16,5 мкл буфера для растворения.

Препарат НК готов для постановки реакции обратной транскрипции.

7.2. Проведение реакции обратной транскрипции

7.2.1. Разморозить содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-ВИЧ+дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при 18–25°C, затем тщательно перемешать на вортексе и осадить капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.2.2. В отдельной пластиковой пробирке приготовить ОТ-смесь путём смешивания буферного раствора «ОТ-буфер», праймеров «Праймеры ОТ-ВИЧ+дНТФ» и обратной транскриптазы:

- 2,0 x (N+1) мкл буферного раствора «ОТ-буфер»,
 - 1,0 x (N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ-ВИЧ+дНТФ»,
 - 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,
- где N+1 – количество анализируемых на наличие нуклеиновых кислот ВИЧ образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.

ВНИМАНИЕ! Обратную транскриптазу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше.

7.2.3. По 3,5 мкл ОТ-смеси добавить в пробирки с выделенным образцом НК и в пробирку «К-», закрыть крышки пробирок.

7.2.4. Пробирки встряхнуть на вортексе в течение 3–5 сек и осадить капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.2.5. Пробирки поместить в термостат и инкубировать при температуре 40°C в течение 30 мин, затем при температуре 95°C в течение 5 мин.

7.2.6. Осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.

Препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

Примечание. Допускается хранение кДНК при температуре минус 20°C в течение 1 месяца.

7.3. Проведение полимеразной цепной реакции

7.3.1. Разморозить при комнатной температуре (18–25°C) ПЦР-буфер из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации, затем тщательно перемешать на вортексе и осадить капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.3.2. Промаркировать необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, с учётом пробирок для положительного контрольного образца «К+» и отрицательного контрольного образца «К-». При использовании для учёта результатов амплификации детектора флуоресценции промаркировать дополнительно две пробирки «ФОН» для контроля фона флуоресценции.

7.3.3. В отдельной пластиковой пробирке, предварительно перемешав реагенты, приготовить смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой:

- 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,
 - 0,5 x (N+1) мкл Taq-полимеразы,
- где N+1 – количество анализируемых на наличие НК вируса иммунодефицита человека образцов с учётом «К-» и «К+» (N) с запасом на 1 образец.

ВНИМАНИЕ! Taq-полимеразу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше времени.

Смесь можно хранить при комнатной температуре (18–25°C) не более 1 ч.

7.3.4. Перемешать приготовленную смесь ПЦР буфера с Taq-полимеразой на вортексе и осадить капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 с.

7.3.5. Во все амплификационные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл тщательно перемешанной смеси ПЦР-буфера с Taq-полимеразой. В пробирки, маркированные «ФОН», внести

по 10 мкл ПЦР-буфера.

- 7.3.6. В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла (20 мкл), закрыть пробирки.
- 7.3.7. Внести в амплификационные пробирки (кроме пробирок «К-», «К+» и «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК.

Примечание. Во избежание контаминации вносить образцы кДНК в амплификационные пробирки наконечниками с фильтрами.

- 7.3.8. В пробирки, промаркированные «К-» и «ФОН», внести по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК и обратную транскрипцию. В пробирку, промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца, закрыть крышки пробирок.
- 7.3.9. Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведённом для амплификаторов с активным регулированием, с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл (таблицы 1 и 2).

Таблица 1

Режим амплификации
для амплификаторов с активным регулированием

№ блока	Для амплификаторов с активным регулированием			Число циклов
	Температура, °С	Время		
		мин	сек	
1	94,0	1	30	1
2	94,0 58,0 64,0	0 0 0	20 15 5	5
3	94,0 58,0 64,0	0 0 0	5 15 5	40
4	10,0	хранение

Таблица 2

Режим амплификации для детектирующих амплификаторов
ДТ-322 и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№ блока	Температура, °C	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	94,0	1	30	1		Цикл
2	94,0	0	10	50	√	Цикл
	58,0	0	25			
	64,0	0	15			
3	10,0	Хранение		Хранение

Таблица 3

Режим амплификации для детектирующего амплификатора
iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo.					
1	1				
		1	00:30	80,0	
		2	01:00	94,0	
2	10				
		1	00:20	94,0	
		2	00:20	58,0	
		3	00:10	64,0	
3	2				
		1	00:20	85,0	Real Time
Программа амплификации					
4	40				
		1	00:10	94,0	
		2	00:10	58,0	
		3	00:30	58,0	Real Time
		4	00:20	64,0	
5		10,0	storage

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов, свяжитесь с представителем компании для уточнения программы амплификации.

Примечание. Продукты амплификации можно хранить при температуре 2–8°C в течение 1 месяца.

Примечание. При детекции с помощью ПЦР–детектора готовые нормировочные пробирки («ФОН») допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии комплекта реагентов для ПЦР–амплификации кДНК. Нормировочные пробирки следует хранить при 2–8°C в течение 1 месяца. При проведении детекции нормировочные пробирки должны иметь комнатную температуру (18–25°C), для чего за 1 ч до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1. Регистрация результатов амплификации с использованием детектора флуоресценции

После прохождения реакции амплификации пробирки поместить в детектор флуоресценции, в соответствии с инструкцией к прибору оформить протокол и провести регистрацию результатов.

8.2. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (п.п. «Создание протокола проведения ПЦР» и «Анализ результатов оптических измерений»).

8.3. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующего амплификатора iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору.

8.4. Регистрация результатов амплификации с использованием электрофореза

8.4.1. Открыть крышки пробирок с продуктами амплификации и проколоть в парафине отверстие с помощью стальной проволоки диаметром 1,0 мм. После прокалывания каждой пробирки проволоку промыть в ёмкости с водопроводной

водой.

- 8.4.2. Для приготовления буферного раствора для электрофореза содержимое пакета со смесью для электрофореза перенести в мерную колбу объёмом 1 л, добавить приблизительно 700 мл дистиллированной воды, перемешать до полного растворения и довести дистиллированной водой до метки.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза можно хранить при комнатной температуре (18–25°C) в течение 1 недели или при температуре 2–8°C в течение 1 мес.

- 8.4.3. Заполнить камеру для электрофореза буферным раствором для электрофореза и поместить пластину с агарозным гелем в камеру для электрофореза.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза должен покрывать пластину с гелем слоем приблизительно 3–5 мм. При работе с агарозным гелем следует обязательно надевать одноразовые медицинские перчатки!

- 8.4.4. Осторожно внести 7,0 мкл продуктов амплификации из каждой амплификационной пробирки в соответствующую лунку агарозного геля под буфер.

- 8.4.5. Установить крышку камеры для электрофореза и подключить источник постоянного тока. Электрофорез проводить при напряжении 20 вольт/см в течение 10 мин (при ширине камеры 10 см напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 200 В).

- 8.4.6. После окончания электрофореза отключить источник постоянного тока, снять крышку с камеры.

- 8.4.7. Вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины, подцепив его с края, и поместить на экран трансиллюминатора.

- 8.4.8. Надеть защитную маску или установить защитный экран, включить трансиллюминатор и проанализировать полученные результаты.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

- 9.1.** Учёт результатов реакции с помощью детектора флуоресценции или детектирующего амплификатора

- 9.1.1. Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется

автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектором флуоресценции или детектирующим амплификатором.

- 9.1.2. В образцах крови, содержащих нуклеиновые кислоты ВИЧ, программа фиксирует положительный результат (детектор флуоресценции) или экспоненциальный рост уровня флуоресценции (детектирующий амплификатор). Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учёт не принимается.
 - 9.1.3. В образцах крови, не содержащих НК ВИЧ, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.
 - 9.1.4. В случае отрицательного результата на наличие НК ВИЧ и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.
 - 9.1.5. При получении положительного результата на наличие НК ВИЧ в отрицательном контроле, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.
- 9.2.** Учёт результатов реакции с помощью гель-электрофореза
- 9.2.1. В положительных образцах должны быть видны полосы оранжево-красного цвета, соответствующие фрагменту генома ВИЧ размером 223 п.н. Наличие или отсутствие полосы внутреннего контрольного образца в этом случае в учёт не принимают.
 - 9.2.2. В отрицательных образцах, в том числе в отрицательном контрольном образце, светящиеся полосы оранжево-красного цвета, соответствующие фрагменту генома ВИЧ размером 223 п.н., должны отсутствовать, а полоса внутреннего контрольного образца (фрагмент ДНК размером 480 п.н.) должна быть отчетливо видна.
 - 9.2.3. В случае отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей фрагменту генома ВИЧ размером 223 п.н. и отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контрольному образцу

(фрагмент ДНК размером 480 п.н.), результат считают недостоверным. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

- 9.2.4. В случае наличия полосы ДНК, соответствующей фрагменту генома ВИЧ размером 223 п.н., в отрицательном контрольном образце, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

- 10.1.** Срок годности набора: формат «FLASH» – 6 месяцев с даты изготовления. Форматы «Форез» и «Real-time» – 9 месяцев с даты изготовления.
- 10.2.** Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить при температуре минус 20°C в течение всего срока годности. Допускается многократное размораживание ПЦР-буфера и минерального масла. Допускается хранение ПЦР-буфера и минерального масла при температуре 2–8°C.
- 10.3.** Комплект реагентов для выделения НК, комплект реагентов для детекции ДНК, пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации следует хранить при температуре 2–8°C в течение всего срока годности набора.
- 10.4.** Смесью ПЦР-буфера с Taq-полимеразой следует хранить при температуре 18–25°C не более 1 ч.
- 10.5.** Раствор буфера для электрофореза можно хранить при комнатной температуре (18–25°C) не более 7 дней или при температуре 2–8°C не более 1 мес.
- 10.6.** Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.
- 10.7.** Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 10.8.** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортировки, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора ВИЧ-ГЕН, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6

ООО «ДНК-Технология»

Тел./факс + 7 (495) 980-45-55

E-mail: help@dna-technology.ru

www.dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

<http://www.dna-technology.ru/support/>

и в Институт государственного контроля лекарственных средств ФГУ «НЦЭСМП» Росздравнадзора:

117246, Москва, Научный проезд, д. 14а

Тел.: +7 (495) 120-60-95, 120-60-96

Номер: 138-4

18.08.11

ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс (495) 980-45-55
E-mail: help@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru