«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

_____ М.Д. Хусаинов

«27» октября 2025 г.

м.п.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени
(РеалБест РНК ВИЧ количественный)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«РеалБест РНК ВИЧ количественный»** предназначен для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) в сыворотке *(плазме)* крови методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Набор предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» *(фирма «Corbett Research», Австралия)*, «Rotor-Gene Q» *(фирма «Qiagen», Германия)*, так и планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» *(фирма «Bio-Rad», США)*, «ДТ-96» *(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)* или их аналогами.

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные. Обеспечивает возможность проведения до 4 независимых процедур выделения по 12 образцов в каждой, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Набор укомплектован всеми необходимыми компонентами для проведения всего комплекса процедур по концентрированию и выделению РНК вируса иммунодефицита человека из сыворотки *(плазмы)* крови, проведению ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени и вычислению количества РНК вируса иммунодефицита человека с учетом калибровочных и контрольных образцов.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного специфического фрагмента кДНК (*полученной методом обратной транскрипции из РНК ВИЧ)*, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данной кДНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5' конце флуоресцентный краситель, а на 3' конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'–3' нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5' конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством кДНК в образце.

Количественный учёт эффективности выделения РНК из образцов обеспечивается выделением РНК вируса иммунодефицита человека из образцов сыворотки *(плазмы)* крови совместно с предварительно **внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО)**, что позволяет контролировать эффективность выделения РНК из анализируемых образцов и учитывать при вычислении концентрации РНК ВИЧ.

2.2. Состав набора:

- концентрирующий раствор – 4 флакона (по 14 мл);
- лизирующий раствор № 1 – 4 флакона (по 4 мл);
- лизирующий раствор № 2 – 4 флакона (по 7 мл);
- осадитель НК – 4 флакона (по 12 мл);
- раствор для отмывки № 1 – 4 флакона (по 8 мл);
- раствор для отмывки № 2 – 4 флакона (по 5 мл);
- элюирующий раствор – 4 флакона (по 3 мл);
- сорбент *(суспензия магнитных частиц)* – 1 флакон (1 мл);
- отрицательный контрольный образец (ОКО) – 2 флакона (по 12 мл);
- внутренний контрольный образец (ВКО) – 2 флакона;
- калибровочные образцы КО1 и КО2 с высоким и низким содержанием РНК ВИЧ – по 1 флакону;
- положительный контрольный образец (ПКО) – 2 флакона;
- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 2 флакона (по 4 мл);
- готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР (ГРС) – 48 пробирок.

Принадлежности:

- завинчивающиеся крышки для флаконов с контрольными и калибровочными образцами – 6 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. **Специфичность выявления РНК вируса иммунодефицита человека** (*по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия)* – 100%.

3.2. Минимальная гарантировано выявляемая концентрация РНК ВИЧ – 20 МЕ/мл **(11,6 копий/мл)*.

3.3. Линейный диапазон – от 86 до 1×10^8 МЕ/мл **(от 50 до $5,8 \times 10^7$ копий/мл)*.

3.4. **Эффективность амплификации** – (100 ± 10)%.

3.5. **Коэффициент вариации**, вычисленный для значений логарифма концентрации РНК вируса иммунодефицита человека – не более 10%.

3.6. **Тест на «линейность»** – характеризует совпадение измеренного значения и предписанного значения *(вычисленного с учётом фактора разведения)* логарифма концентрации РНК ВИЧ в образце, приготовленном разведением из образца с известной концентрацией РНК ВИЧ – (100 ± 10) %.

3.7. **Эффективность выявления** различных субтипов ВИЧ-1 подтверждена анализом 2-й международной референсной панели ВОЗ субтипов ВИЧ-1 *(NIBSC код 12/224, включает субтипы A, B, C, D, CRF 01_AE, F, G, AG-GH и группы O и N)* и 1-й международной референсной панели ВОЗ *циркулирующих рекомбинантных форм (CRF)* ВИЧ-1 *(NIBSC код 13/214)*.

***** *При необходимости получения результатов в копиях вирусного генома на 1 мл анализируемой пробы необходимо умножить полученное значение в МЕ на 0.58.*

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности *(опасности)* и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать **одноразовые** медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их

перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать **только одноразовые** наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами де-зинфицирующими средствами *(такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1–3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5–1% раствор «Мистраль»; 0,5–2% раствор «Велтолен»)*.

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией *(см. МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»)*.

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются *(утилизируются)* в соответствии с 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».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ:

–амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» *(фирма «Corbett Research», Австралия)*, «Rotor-Gene Q» *(фирма «Qiagen», Германия)* или планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» *(фирма «Bio-Rad», США)*, «ДТ-96» *(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)* или их аналоги;

–ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты *(бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы»)*;

–холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;

–микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» *(фирма «Eppendorf», Германия)*;

–встряхиватель для пробирок *(Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия)*;

–термошейкер – термостатируемый встряхиватель орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 1300 об/мин и при температуре 56 °С *(Thermo Shaker TS-100 с блоком SC20N, фирма «BioSan», Латвия)*;

–пипетки полуавтоматические *(дозаторы механические)* одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками *(фирма «Biohit», Финляндия)*;

–перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые *(перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия)*;

–одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ *(фирма «FinnTip», Финляндия)*;

–одноразовые наконечники для пипеток без фильтра *(фирма «FinnTip», Финляндия)*;

–одноразовые полипропиленовые пробирки на 2 мл *(фирма «SSI», США, кат. № 2340)*;

–магнитный штатив для выделения нуклеиновых кислот *(АО «Вектор-Бест», кат. № Е 9291)*;

–штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл *(фирма «Хеликон», Россия)*;

–отсасыватель медицинский *(В-40, «ВИСМА-ПЛАНАР»)*;

–контейнер для сбора отходов *(например, «Контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ, или аналогичный)*.

6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка образцов сыворотки *(плазмы)* крови

Внимание! ***Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной плазмы.***

В течение 6 часов после взятия крови следует отобрать сыворотку *(плазму)* в отдельную пробирку.

Транспортировать и хранить образцы:

–при температуре (18–25) °С до 2 часов;

– при температуре (2–8) °С не более суток;

– при температуре минус 20 °С до 2 недель.

Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

Образцы сыворотки или плазмы крови перед использованием необходимо центрифугировать при 13000 об/мин в течение 5 минут при температуре (18–25) °С.

6.2. Подготовка компонентов набора:

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать компоненты набора при температуре (18–25) °С в течение 30 минут.

6.2.2. Вскрыть флакон с ПКО, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятые крышки и пробки поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Добавить **1 мл раствора для восстановления контрольных образцов (РВК)**, плотно закрыть флакон новой пластиковой крышкой, входящей в состав набора. Аккуратно перемешать, выдержать 15 минут при температуре (18–25) °С, после чего вновь тщательно перемешать.

6.2.3. Вскрыть флаконы с калибраторами *(КО1 и КО2)*, удалив пластиковые крышки и резиновые пробки. Снятые крышки и пробки поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Добавить по **1 мл раствора для восстановления контрольных образцов (РВК)**, плотно закрыть флаконы новыми крышками, входящими в состав набора. Аккуратно перемешать, выдержать 15 минут при температуре (18–25) °С, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения хранить при (2–8) °С не более 1 месяца.

6.2.4. Вскрыть флакон с **внутренним контрольным образцом (ВКО)**, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятые крышки и пробки поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Добавить **1 мл раствора для восстановления контрольных образцов (РВК)**, плотно закрыть флакон новой пластиковой крышкой, входящей в состав набора. Аккуратно перемешать, выдержать 15 минут при температуре (18–25) °С, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения хранить при (2–8) °С не более 1 месяца.

6.2.5. **Отрицательный контрольный образец (ОКО)** готов к применению. После вскрытия флакона хранить при (2–8) °С не более 1 месяца.

6.2.6. Лизирующие растворы перед началом работы прогреть при (50–60) °С до растворения осадка. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом до состояния гомогенной суспензии и во флакон с лизирующим раствором № 2 добавить **140 мкл суспензии сорбента**. Тщательно перемешать.

Внимание! *Лизирующий раствор № 2 после вскрытия и добавления суспензии сорбента хранению не подлежит.*

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение РНК из 1 мл сыворотки *(плазмы)* крови.

7.1.1. При выборе количества анализируемых образцов для выделения РНК необходимо предусмотреть, чтобы каждая группа выделяемых образцов и каждая индивидуальная постановка ОТ-ПЦР содержала 3 КО1, 3 КО2, 1 ОКО и 1 ПКО.

Внимание! *Калибровочные образцы 1 и 2 (КО1 и КО2) проходят процедуру выделения РНК и ОТ-ПЦР при проведении первой реакции с наборами данной серии и на данном приборе. В последующих анализах возможна постановка только двух контрольных точек: ОКО и ПКО, а калибровочный график импортируется из первого анализа.*

7.1.2. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объёмом 2 мл *(по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли).*

7.1.3. В каждую пробирку внести по **30 мкл раствора ВКО**.

7.1.4. Для отрицательного контроля в пробирку *(маркированную «ОКО»)* внести **1 мл ОКО**.

7.1.5. Для положительного контроля в пробирку *(маркированную «ПКО»)* внести **970 мкл ОКО** и **30 мкл ПКО**.

7.1.6. В пробирки с маркировкой «КО1» и «КО2» внести по **970 мкл ОКО** и **30 мкл соответствующего калибровочного образца**.

7.1.7. В остальные пробирки пипеткой с отдельными наконечниками внести по **1 мл анализируемых образцов сыворотки или плазмы крови** в соответствии с маркировкой пробирок.

7.1.8. В каждую пробирку, не задевая стенок, внести по **1 мл концентрирующего раствора**.

7.1.9. Пробирки закрыть крышками, содержимое пробирок тщательно перемешать

переворачиванием 5 раз и выдержать при температуре (18–25) °С в течение 10–15 минут. Затем центрифугировать в течение 5 минут при 3000 об/мин при температуре (18–25) °С*.

**Параметры центрифугирования зависят от модели используемой центрифуги:*

Eppendorf MiniSpin – 3000 об/мин;

Eppendorf 5415D – 2000 об/мин;

Eppendorf 5417C – 2000 об/мин;

Heraeus BiofugePico – 2000 об/мин.

7.1.10. Из каждой пробирки пипеткой *(или отсасывателем)* с отдельным наконечником максимально полно удалить надосадочную жидкость.

7.1.11. В каждую пробирку к полученному осадку добавить по **200 мкл лизирующего раствора № 1**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд, чтобы осадок отслоился от дна пробирки. Выдержать 5 минут при температуре (18–25) °С. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирки.

7.1.12. В каждую пробирку *(с лизирующим раствором № 1)* добавить по **500 мкл лизирующего раствора № 2 с сорбентом**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Выдержать в термошейкере при 56 °С в течение 10 минут с частотой вращения 1300 об/мин. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

7.1.13. В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести по **750 мкл осадителя НК.**

7.1.14. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Оставить при температуре (18–25) °С на 3–5 минут. Центрифугировать в течение 5 минут при 13000 об/мин.

7.1.15. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки пипеткой *(или отсасывателем)* с отдельным наконечником отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.1.16. В каждую пробирку к осадку добавить **500 мкл раствора для отмывки № 1**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Центрифугировать 5 минут при 13000 об/мин.

7.1.17. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой *(или отсасывателем)* с отдельным наконечником, не задевая осадок.

7.1.18. В каждую пробирку к осадку добавить по **300 мкл раствора для отмывки № 2**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Центрифугировать 5 минут при 13000 об/мин.

7.1.19. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой *(или отсасывателем)* с отдельным наконечником, не задевая осадок.

7.1.20. Высушить осадки в открытых пробирках при температуре (18–25) °С в течение 2–3 минут.

7.1.21. В каждую пробирку к осадку добавить **по 200 мкл элюирующего раствора**. Тщательно ресуспендировать осадок на вортексе. Инкубировать в термошейкере при 56 °С в течение 10 минут с частотой вращения 1300 об/мин. Центрифугировать 1 минуту при 13000 об/мин.

Пробы готовы к постановке ОТ-ПЦР-анализа.

Внимание! *Выделенная РНК хранению не подлежит.*

Готовить в день проведения ОТ-ПЦР.

7.2. Выделение РНК из 100 мкл сыворотки *(плазмы)* крови.

При малом объёме исследуемой сыворотки *(плазмы)* набор может быть применён для выявления РНК ВИЧ в 100 мкл образца. Необходимо учитывать, что в этом случае не гарантировано выявление РНК ВИЧ в концентрации менее 200 МЕ/мл *(116 копий/мл)* и линейный диапазон количественных измерений составляет 860 – 10^9 МЕ/мл *(500 – $5{,}8*10^8$ копий/мл).*

7.2.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объёмом 2 мл *(по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли).*

7.2.2. В каждую пробирку внести по **30 мкл раствора ВКО**.

7.2.3. Для отрицательного контроля в пробирку *(маркированную «ОКО»)* внести **100 мкл ОКО**.

7.2.4. Для положительного контроля в пробирку *(маркированную «ПКО»)* внести **70 мкл ОКО и 30 мкл ПКО**.

7.2.5. В пробирки с маркировкой «КО1» и «КО2» внести по **70 мкл ОКО** и **30 мкл**

соответствующего калибровочного образца.

7.2.6. В остальные пробирки пипеткой с отдельными наконечниками внести по **100 мкл анализируемых образцов сыворотки или плазмы** крови в соответствии с маркировкой пробирок.

7.2.7. В каждую пробирку добавить по **500 мкл лизирующего раствора № 2 с сорбентом**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Выдержать в термошейкере при 56 °С в течение 10 минут с частотой вращения 1300 об/мин. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

7.2.8. В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести по **600 мкл осадителя НК**.

7.2.9. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Оставить при температуре (18–25) °С на 3–5 минут. Центрифугировать при температуре (18–25) °С в течение 5 минут при 13000 об/мин.

7.2.10. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки пипеткой *(или отсасывателем)* с отдельным наконечником отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.2.11. В каждую пробирку к осадку добавить **500 мкл раствора для отмывки № 1**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Центрифугировать 5 минут при 13000 об/мин.

7.2.12. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой *(или отсасывателем)* с отдельным наконечником, не задевая осадок.

7.2.13. В каждую пробирку к осадку добавить по **300 мкл раствора для отмывки № 2**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Центрифугировать 5 минут при 13000 об/мин.

7.2.14. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой *(или отсасывателем)* с отдельным наконечником, не задевая осадок.

7.2.15. Высушить осадки в открытых пробирках при температуре (18–25) °С в течение 2–3 минут.

7.2.16. В каждую пробирку к осадку добавить по **200 мкл элюирующего раствора**. Тщательно ресуспендировать осадок на вортексе. Инкубировать в термошейкере при 56 °С в течение 10 минут с частотой вращения 1300 об/мин. Центрифугировать 1 минуту при 13000 об/мин.

Пробы готовы к постановке ОТ-ПЦР-анализа.

Внимание! *Выделенная РНК хранению не подлежит. Готовить в день проведения ОТ-ПЦР.*

7.3. Проведение ОТ-ПЦР.

7.3.1. Пробирки с подготовленными пробами установить в магнитный штатив.

7.3.2. Необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контроли)* микропробирок с **готовой реакционной смесью для ОТ-ПЦР (ГРС)** пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! *Для приборов «iQ/iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96» надписи следует располагать на боковой части пробирки.*

Для приборов «Rotor-Gene 3000/6000, Q» надписи следует располагать на крышке пробирки.

7.3.3. В каждую микропробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести из пробирок, установленных в магнитный штатив *(не захватывать частицы сорбента!)* **50 мкл соответствующего раствора выделенной РНК** и перемешать содержимое микропробирки.

7.3.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.3.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента **РНК ВИЧ** и **ВКО** и детекции флуоресцентных сигналов.

7.3.6. Запрограммировать протокол проведения реакции ОТ-ПЦР:

для амплификаторов «iQ/iQ5 iCycler, «CFX96», «ДТ-96»:

1 стадия: 45 °С – 30 минут;

2 стадия: 94 °С – 1 минута;

3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд).*

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

для амплификаторов «Rotor-Gene 3000/6000, Q»:

1 стадия: 45 °С – 30 минут;

2 стадия: 94 °С – 1 минута;

3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 40 секунд).*

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.3.7. Для регистрации процесса амплификации **кДНК ВКО** следует выбрать канал детекции **«FAM»** *(для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»)*, **«Green»** *(для приборов «Rotor-Gene 6000/Q»).*

Для регистрации процесса амплификации **кДНК ВИЧ** следует выбрать канал детекции **«ROX»** *(для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»)*, **«Orange»** *(для приборов «Rotor-Gene 6000/Q»).*

7.3.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, калибровочными образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

7.3.9. Запустить программу и провести ОТ-ПЦР с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов в случае использования планшетных амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96» выполняется программой **«РеалБест диагностика»** *(программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов).*

При использовании других амплификаторов анализ результатов выполняется в автоматическом режиме в соответствии с настройками, указанными в инструкции по использованию прибора.

9. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Условия анализа результатов.

9.1.1. В **ПКО** должно фиксироваться:

- нарастание сигнала специфического продукта амплификации **кДНК ВИЧ** *(канал «ROX»)* и определяться значение порогового цикла **Ct ВИЧ**;
- нарастание сигнала амплификации **кДНК ВКО** *(канал «FAM»)* и определяться значение порогового цикла **Ct ВКО**.

9.1.2. Результаты индивидуальной постановки ОТ-ПЦР подлежат анализу и учёту, если для ПКО значение **Ct** ВИЧ находится в диапазоне, указанном во вкладыше в наборы данной серии.

9.1.3. В **ОКО** должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО и определяться **Ct** ВКО, при этом не должно быть достоверного нарастания сигнала специфического продукта амплификации кДНК ВИЧ.

Если для ОКО значение **Ct** ВИЧ **меньше или равно 40**, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. Порядок действий в таком случае см. в п. 9.2.4.

9.1.4. В **каждом исследуемом образце** должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО *(канал «FAM»)* и определяться **Ct** ВКО. Анализ пробы считается действительным, если для этого образца значение **Ct** ВКО по каналу **«FAM» меньше или равно 40.**

9.2. Учёт результатов.

9.2.1. Вычислить $(\mathbf{Ct}\ ВКО)_{ср}$ как среднее значение **Ct** ВКО всех анализируемых образцов *(включая ПКО, КО1, КО2 и ОКО).* Отбраковке подлежат значения **Ct** ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(\mathbf{Ct}\ ВКО)_{ср}$. После отбраковки пересчитать $(\mathbf{Ct}\ ВКО)_{ср}$ для оставшихся значений.

9.2.2. Анализируемый образец учитывается **как отрицательный** *(не содержащий РНК ВИЧ)*, если для этого образца значение **Ct** по каналу **«ROX» больше 40 или не определяется**.

Если для такого образца значение **Ct** ВКО отличается от значения $(\mathbf{Ct}\ ВКО)_{ср}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

В случае повторения результата следует провести повторный забор образца крови и снова повторить анализ.

9.2.3. Анализируемый образец учитывается **как положительный**, т.е. содержащий **РНК ВИЧ**, если для этого образца значение **Ct** по каналу **«ROX» меньше или равно 40**.

9.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ОТ-ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для

которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать, как отрицательные.

9.3. Количественный анализ результатов.

Для количественного анализа рассчитать концентрацию РНК ВИЧ в исследуемых образцах в соответствии с **Приложением** или с применением сервисной компьютерной программы **«РеалБест Диагностика»** *(которая проводит все операции по отбраковке и анализу образцов и приводит результаты в виде таблицы с концентрациями РНК ВИЧ в анализируемых пробах).*

Внимание! *Если выделение РНК производилось из 100 мкл образца, полученный результат следует умножить на 10.*

9.3.1. Если вычисленное значение концентрации РНК ВИЧ в образце находится в диапазоне от 86 до 1×10^8 МЕ/мл *(от 50 до $5{,}8 \times 10^7$ копий/мл)*, результат учитывается **как положительный** с указанием полученной концентрации РНК ВИЧ в образце в МЕ/мл *(копий/мл).*

9.3.2. Если вычисленное значение концентрации РНК ВИЧ больше 10^8 МЕ/мл *($5{,}8 \times 10^7$ копий/мл)*, то результат рекомендуется интерпретировать **как положительный** с концентрацией РНК ВИЧ «больше 10^8 МЕ/мл *($5{,}8 \times 10^7$ копий/мл)».*

9.3.3. Если вычисленное значение концентрации РНК ВИЧ меньше 86 МЕ/мл *(50 копий/мл)*, то результат рекомендуется интерпретировать **как положительный** с концентрацией РНК ВИЧ «меньше 86 МЕ/мл *(50 копий/мл)».*

9.3.4. Анализируемый образец учитывается **как отрицательный** *(не содержащий РНК ВИЧ)*, если для этого образца значение **Ct** по каналу **«ROX» больше 40 или не определяется**.

9.3.5. Если полученная концентрация ПКО не укладывается в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить анализ всех образцов данной постановки.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание наборов не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности. Замораживание наборов не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора **«РеалБест РНК ВИЧ количественый»** требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

*По вопросам, касающимся качества набора **«РеалБест РНК ВИЧ количественный»**, следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:*

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,
тел. (383) 252-51-62, 227-60-30;
тел./факс (383), 252-51-81, 252-51-77.
E-mail: plkobtk@vector-best.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ
Расчёт концентрации специфической вирусной НК

При постановке реакции на приборе «iQ5 iCycler», «CFX96» *(«Bio-Rad», США)* все операции по количественному анализу образцов можно провести с применением сервисной компьютерной программы **«РеалБест Диагностика»**, поставляемой в качестве приложения к наборам.

В случае отсутствия указанного программного обеспечения или при постановке реакции на других приборах количественный анализ специфической вирусной НК следует производить по следующим формулам:

Рассчитываем **коэффициент β**:

$\beta = [Lg(C_{КО1}) - Lg(C_{КО2})] / [\Delta Ct_{КО2} - \Delta Ct_{КО1}]$,

где: **$C_{КО1}$** и **$C_{КО2}$** – концентрации специфической вирусной НК в калибровочных образцах *(указаны во вкладыше набора)*;

$$\Delta Ct_{КО1} = Ct_{КО1ср} - Ct_{ВКО\ КО1ср};$$

$$\Delta Ct_{КО2} = Ct_{КО2ср} - Ct_{ВКО\ КО2ср};$$

$Ct_{КО1ср}$, $Ct_{КО2ср}$ – средние значения **Ct** для образцов КО1 и КО2 по каналу **«ROX»**;

$Ct_{ВКО\ КО1ср}$, $Ct_{ВКО\ КО2ср}$ – средние значения **Ct** для образцов КО1 и КО2 по каналу **«FAM»**.

Рассчитываем концентрацию специфической вирусной НК в анализируемом образце

$C_{обр\ k} = C_{КО2} \times 10^{\beta(\Delta CtКО2 - \Delta Ctобр\ k)}$,

где: **k** – номер образца;

$$\Delta Ct_{обр\ k} = Ct_{обр\ k} - Ct_{ВКОобр\ k},$$

где **$Ct_{обр\ k}$** и **$Ct_{ВКОобр\ k}$** – значения **Ct** данного **k-ого** образца по каналам **«ROX»** и **«FAM»** соответственно.

В случае, если выделение и постановка ОТ-ПЦР для КО1 и КО2 не проводится, в расчётную формулу подставляются значения **β** и $\Delta Ct_{КО2}$, полученные в первой постановке анализа набором данной серии.

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ n	Содержимого достаточно для проведения n количества тестов	NON STERILE	Не стерильно
LOT	Код партии		Температурный диапазон
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число	i	Обратитесь к Инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-71.