

Вкладыш в инструкцию

Набор реагентов для качественного дифференциального выявления методом ОТ и ПЦР в режиме реального времени РНК вирусов гриппа А, в том числе с дифференциацией пандемического субтипа H1pdm09, гриппа В и коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале «Грипп-А/H1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР» по ТУ 21.20.23-489-41390295-2023

Вариант исполнения Standard

В данном варианте исполнения медицинского изделия использовать один из предложенных амплификаторов в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 – Амплификаторы для анализа

Вариант исполнения	Амплификатор для анализа
Standard	Rotor-Gene Q, ДТ-96, ДТпрайм, CFX96, QuantStudio 5

Примечание – при использовании прибора CFX, он должен быть прогрет перед запуском эксперимента не менее 15 мин.

1.	ПОДГОТОВКА К ИССЛЕДОВАНИЮ																	
1.1.	Условия проведения анализа Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки амплификатора. Запрограммировать прибор согласно инструкции производителя. В случае возникновения трудностей с программированием прибора рекомендуем обратиться за помощью к специалисту компании ООО «ИМБИАН ЛАБ». Скачать файлы с готовыми параметрами тестов можно с сайта www.imbian.ru или запросить через почту info@imbian.ru, и установить в соответствии с инструкцией на сайте или в письме. Режим программирования представлен в таблице 2. <i>Таблица 2 – Температурно-временной режим амплификации</i> <table><tr><th>№ п/п</th><th>Температурно-временной режим</th><th>Число циклов</th></tr><tr><td>1</td><td>50 °С – 15 мин</td><td>1</td></tr><tr><td>2</td><td>95 °С – 3 мин</td><td>1</td></tr><tr><td rowspan="3">3</td><td>95 °С – 10 с</td><td rowspan="3">5</td></tr><tr><td>56 °С – 10 с</td></tr><tr><td>72 °С – 10 с</td></tr><tr><td>4</td><td>95 °С – 10 с</td><td>40</td></tr></table>	№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов	1	50 °С – 15 мин	1	2	95 °С – 3 мин	1	3	95 °С – 10 с	5	56 °С – 10 с	72 °С – 10 с	4	95 °С – 10 с	40
№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов																
1	50 °С – 15 мин	1																
2	95 °С – 3 мин	1																
3	95 °С – 10 с	5																
	56 °С – 10 с																	
	72 °С – 10 с																	
4	95 °С – 10 с	40																

	<table><tr><td>56 °C – 15 с, детекция HEX¹, FAM², ROX³, Cy5⁴, Cy5.5⁵</td><td rowspan="2"></td></tr><tr><td>72 °C – 15 с</td></tr></table>	56 °C – 15 с, детекция HEX ¹ , FAM ² , ROX ³ , Cy5 ⁴ , Cy5.5 ⁵		72 °C – 15 с
56 °C – 15 с, детекция HEX ¹ , FAM ² , ROX ³ , Cy5 ⁴ , Cy5.5 ⁵				
72 °C – 15 с				
	После завершения программы амплификации отработанные пробирки утилизируют в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.			
2.	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА			
2.1.	Этапы проведения амплификации Подготовка этапа амплификации 1. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ ПЦР в РВ. Допускается размораживание реагентов из набора перед работой при температуре не выше +45 °C (с использованием термостата). 2. Пробирку с Разбавителем нельзя греть в термостате! Разбавитель необходимо размораживать при температуре от +15 °C до +25 °C до полной разморозки. <i>Примечание – перед запуском эксперимента прогреть прибор CFX не менее 15 мин (если используется).</i> <i>Внимание! При использовании амплификаторов со считыванием через крышку (например, ДТ-96), запрещается наносить маркировку на крышку пробирок!</i>			
2.2.	Подготовка реакционной смеси Общий объем реакционной смеси – 30,0 мкл, объем НК-пробы – 10,0 мкл. 1. Отобрать необходимое количество пробирок объёмом 0,2 мл, исходя из количества выделенных проб (включая ОКВ) плюс положительный и отрицательный контроли для проведения ОТ и ПЦР. Промаркировать пробирки. 2. В отдельной одноразовой пробирке смешать компоненты набора из расчета на каждую реакцию: ○ ПЦР-Смесь Грипп ABSH1 – 10,0 мкл;			

¹ При необходимости, детекция сигнала для флуорофора HEX осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров R6G, JOE, Yellow и VIC.

² При необходимости, детекция сигнала для флуорофора FAM осуществляется по каналу детекции для аналогичного флуорофора Green.

³ При необходимости, детекция сигнала для флуорофора ROX осуществляется по каналу детекции для аналогичного флуорофора Texas Red.

⁴ При необходимости, детекция сигнала для флуорофора Cy5 осуществляется по каналу детекции для аналогичного флуорофора Red.

⁵ При необходимости, детекция сигнала для флуорофора Cy5.5 осуществляется по каналу детекции для аналогичного флуорофора ABY.

	○ Разбавитель – 10,0 мкл. 3. Перемешать смесь на вортексе в течение 2–5 секунд и сбросить капли кратковременным центрифугированием (2–5 секунд). Постараться не допускать вспенивания реакционной смеси. 4. В приготовленные пробирки для ОТ и ПЦР внести по 20,0 мкл реакционной смеси. 5. После этого последовательно внести: ○ в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) – 10,0 мкл ОКО; ○ в ряд пробирок для исследуемых проб – в каждую внести по 10,0 мкл НК соответствующей пробы (включая пробу ОКВ); ○ в пробирку с положительным контролем ПЦР (К+) – 10,0 мкл ПКО Грипп ABSH1. <i>Примечание – при работе с амплификаторами планшетного типа сбросить капли со стенок пробирок с помощью вортекса.</i>										
3.	УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ										
3.1.	<i>Первичная обработка данных</i> Перед началом анализа полученных результатов необходимо провести первичную обработку полученных данных. для этого необходимо применить настройки, указанные в таблице 3. <i>Таблица 3 – Первичная обработка полученных данных</i> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Амплификатор</th><th>Настройки для обработки данных</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Rotor-Gene Q</td><td>«Dynamic tube»/«Динамич. фон» «Slope Correct»/«Коррект. уклона» «Outlier Removal»/«Устранение выбросов» – 10 % Threshold – 0,05</td></tr> <tr> <td>ДТ-96, ДТпрайм</td><td>Тип анализа «Мультиплекс». Метод – «Пороговый (Ct)».</td></tr> <tr> <td>CFX96</td><td>Режим анализа данных Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted Curve Fit (установлен по умолчанию). Baseline Threshold – на уровне 10–20 % от максимального уровня флуоресценции образца К+.</td></tr> <tr> <td>QuantStudio 5</td><td>Критерий оценки формы графика амплификации заменить на оценку статуса амплификации по каждому каналу: Отметка «Amp» в столбце «Amp Status» соответствует оценке S-образной формы графика амплификации по анализируемому каналу детекции флуоресценции. Результат учитывается согласно таблицам 4-5.</td></tr> </tbody> </table>	Амплификатор	Настройки для обработки данных	Rotor-Gene Q	«Dynamic tube»/«Динамич. фон» «Slope Correct»/«Коррект. уклона» «Outlier Removal»/«Устранение выбросов» – 10 % Threshold – 0,05	ДТ-96, ДТпрайм	Тип анализа «Мультиплекс». Метод – «Пороговый (Ct)».	CFX96	Режим анализа данных Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted Curve Fit (установлен по умолчанию). Baseline Threshold – на уровне 10–20 % от максимального уровня флуоресценции образца К+.	QuantStudio 5	Критерий оценки формы графика амплификации заменить на оценку статуса амплификации по каждому каналу: Отметка «Amp» в столбце «Amp Status» соответствует оценке S-образной формы графика амплификации по анализируемому каналу детекции флуоресценции. Результат учитывается согласно таблицам 4-5.
Амплификатор	Настройки для обработки данных										
Rotor-Gene Q	«Dynamic tube»/«Динамич. фон» «Slope Correct»/«Коррект. уклона» «Outlier Removal»/«Устранение выбросов» – 10 % Threshold – 0,05										
ДТ-96, ДТпрайм	Тип анализа «Мультиплекс». Метод – «Пороговый (Ct)».										
CFX96	Режим анализа данных Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted Curve Fit (установлен по умолчанию). Baseline Threshold – на уровне 10–20 % от максимального уровня флуоресценции образца К+.										
QuantStudio 5	Критерий оценки формы графика амплификации заменить на оценку статуса амплификации по каждому каналу: Отметка «Amp» в столбце «Amp Status» соответствует оценке S-образной формы графика амплификации по анализируемому каналу детекции флуоресценции. Результат учитывается согласно таблицам 4-5.										

		Отметка «No Amp» в столбце «Amp Status» соответствует оценке неправильной, линейной форме графика амплификации по анализируемому каналу детекции флуоресценции. Амплификация с обозначением «No Amp» должна учитываться как отрицательная по анализируемому каналу детекции флуоресценции. Пробы с отметкой «Inconclusive» учитываются также как и пробы с отметкой «Amp».
--	--	---

3.2.

Анализ результатов

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией производителя к прибору. Учет результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца).

Оценка валидности результатов и анализ результатов исследования

Перед началом анализа следует оценить прохождение контролей в ОКВ, ОКО и ПКО Грипп ABSH1 в соответствии с таблицей 4.

Сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента:

- НК гриппа А (Influenza A virus) регистрируется по каналу для флуорофора ROX;
- НК пандемического субтипа H1pdm09 гриппа А регистрируется по каналу для флуорофора Cy5;
- НК гриппа В (Influenza B virus) регистрируется по каналу для флуорофора Cy5.5;
- НК коронавируса SARS-CoV-2 детектируется по каналу для флуорофора FAM;
- НК ВКО1 детектируется по каналу для флуорофора HEX.

Результат ПЦР-анализа считать достоверным, если значения Ct для контролей амплификации лежат в пределах нормы (этап успешно пройден).

Таблица 4 – Оценка контролей ОТ ПЦР РВ

Контроль	Диапазон Ct по каналу					Результат
	HEX ВКО1	FAM SARS-CoV-2	ROX Грипп А	Cy5 H1pdm09	Cy5.5 Грипп В	
ОКВ	Значение	Нет значений либо значения >35.				Норма. Экстракция

		< 28		прошла успешно.
		Значение ≥ 28	Значение ≤ 35 по одному или нескольким каналам.	Результат невалидный. Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка!
	ОКО	Нет значений, либо значения >35 .		Норма. ОТ и ПЦР прошла успешно.
		Значение ≤ 35 по одному или нескольким каналам.		Результат невалидный. Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка!
	ПКО Грипп ABSH1	Значение от 1 до 35.		Норма. ОТ и ПЦР прошла успешно.
		Значение по одному или нескольким каналам ≥ 35 или отсутствует значение по одному или нескольким каналам.		Результат невалидный, требуется перестановка.

Появление значения C_t ниже 35 в таблице результатов для отрицательного контроля ОКО и любого значения на каналах HEX, ROX, Cy5 и Cy5.5 для контроля экстракции ОКВ свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов в зонах проведения ПЦР и выделения соответственно. В этом случае результаты анализа для всех проб считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации. В случае успешного прохождения контролей оценить результаты анализа в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5 – Анализ результатов исследования

№ п/п	Результат	Интерпретация
1.	Значение C_t по каналу для флуорофора HEX (ВКО1) отсутствует или определено ≥ 28 при этом значения C_t по остальным каналам отсутствуют.	Невалидный! Сбой ВКО1! Требуется повторить анализ с этапа экстракции.
2.	Значения C_t по каналам для флуорофоров FAM определены выше 35, при этом значение C_t по каналу для флуорофора HEX определено не выше 28.	НК SARS-CoV-2 не обнаружена.
3.	Значения C_t по каналам для флуорофоров ROX определены выше 35, при этом значение C_t по каналу для флуорофора HEX определено не выше 28.	НК Influenza virus A не обнаружена.

4.	Значения Ct по каналам для флуорофоров ROX и Cy5 определены выше 35, при этом значение Ct по каналу для флуорофора HEX определено не выше 28.	НК Influenza virus A H1pdm09 не обнаружена.
5.	Значения Ct по каналам для флуорофоров Cy5.5 определены выше 35, при этом значение Ct по каналу для флуорофора HEX определено не выше 28.	НК Influenza virus B не обнаружена.
6.	Значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено от 1 до 35 включительно, при этом значение Ct по каналу для флуорофора HEX определено либо отсутствует.	НК SARS-CoV-2 обнаружена.
7.	Значение Ct по каналу для флуорофора ROX определено от 1 до 35 включительно, при этом значение Ct по каналу для флуорофора HEX определено либо отсутствует.	НК Influenza virus A обнаружена.
8.	Значения Ct по каналу для флуорофоров ROX и Cy5 определены от 1 до 35 включительно, при этом значение Ct по каналу для флуорофора HEX определено либо отсутствует.	НК Influenza virus A H1pdm09 обнаружена.
9.	Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 определено от 1 до 35 включительно, при этом значение Ct по каналу для флуорофора HEX определено либо отсутствует.	НК Influenza virus B обнаружена.

Приложение 1. Матрица для заполнения образцов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

