

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 LF1

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
LF1	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 °C – 15 мин</td><td>1</td></tr><tr><td>2</td><td>95 °C – 3 мин</td><td>1</td></tr><tr><td rowspan="3">3</td><td>95 °C – 10 с</td><td rowspan="3">5</td></tr><tr><td>56 °C – 10 с</td></tr><tr><td>72 °C – 10 с</td></tr></table>	№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов	1	50 °C – 15 мин	1	2	95 °C – 3 мин	1	3	95 °C – 10 с	5	56 °C – 10 с	72 °C – 10 с
№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов													
1	50 °C – 15 мин	1													
2	95 °C – 3 мин	1													
3	95 °C – 10 с	5													
	56 °C – 10 с														
	72 °C – 10 с														

	4	95 °C – 10 с	40
		56 °C – 15 с, детекция HEX ¹ , FAM ² , ROX ³ , Cy5 ⁴ , Cy5.5	
		72 °C – 15 с	
После завершения программы амплификации отработанные пробирки утилизируют в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.			
2.	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА		
2.1.	<i>Этапы проведения амплификации</i> <i>Подготовка реакционной смеси</i> 1. Отобрать необходимое количество стрипов с лиофилизированной готовой реакционной смесью, исходя из количества выделенных проб (включая ОКВ) плюс положительный и отрицательный контроли для проведения ОТ и ПЦР. 2. После этого последовательно внести: ○ в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) – 30,0 мкл ОКО; ○ в ряд пробирок для исследуемых проб – в каждую внести по 30,0 мкл НК соответствующей пробы (включая пробу ОКВ); ○ в пробирку с положительным контролем ПЦР (К+) – 30,0 мкл ПК О АВСН1. <i>Примечания:</i> 1. при внесении проб в пробирки, необходимо 3–4 раза пипетировать вносимую пробу; 2. при необходимости сбросить капли со стенок пробирок с помощью вортекса или вручную. 3. Заклеить стрипы оптической плёнкой. <i>Внимание! Не рекомендуется наносить на оптическую пленку какие-либо надписи. Вы можете зафиксировать наименования проб на матрице образцов.</i>		
3.	УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ		

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.

3.1.

Первичная обработка данных

Перед началом анализа полученных результатов необходимо провести первичную обработку полученных данных. для этого необходимо применить настройки, указанные в таблице 3.

Таблица 3 – Первичная обработка полученных данных

Амплифика тор	Настройки для обработки данных
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 K+
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 ABSN1 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 H1pdm0 9	Cy5.5 Грип п В	
ОКВ	Значение < 28	Нет значений либо значения >35.				Норма. Экстракция 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 Грип и ABS H1	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 Ct 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 Ct по каналу для флуорофора HEX (ВКО1) отсутствует или определено ≥ 28 при этом значения Ct по остальным каналам отсутствуют.	Невалидный! Сбой ВКО1! Требуется повторить анализ с этапа экстракции.
2.	Значения Ct по каналам для флуорофоров FAM определены выше 35, при этом значение Ct по каналу для флуорофора HEX определено не выше 28.	НК SARS-CoV-2 не обнаружена.
3.	Значения Ct по каналам для флуорофоров ROX определены выше 35, при этом значение Ct 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.	HK 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.	HK 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.	HK 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.	HK 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.	HK 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.	HK Influenza virus B обнаружена.



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