

## 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+Auto

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+Auto           | ДТ-96, ДТпрайм, CFX96, QuantStudio 5 |

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

| 1.    | <b>ПОДГОТОВКА К ИССЛЕДОВАНИЮ</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |              |                              |              |   |                |   |   |               |   |   |              |   |              |              |   |              |    |  |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|---|----------------|---|---|---------------|---|---|--------------|---|--------------|--------------|---|--------------|----|--|
| 1.1.  | <p><b>Условия проведения анализа</b></p> <p>Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки амплификатора. Запрограммировать прибор согласно инструкции производителя.</p> <p>В случае возникновения трудностей с программированием прибора рекомендуем обратиться за помощью к специалисту компании ООО «ИМБИАН ЛАБ».</p> <p>Скачать файлы с готовыми параметрами тестов можно с сайта <a href="http://www.imbian.ru">www.imbian.ru</a> или запросить через почту <a href="mailto:info@imbian.ru">info@imbian.ru</a>, и установить в соответствии с инструкцией на сайте или в письме. Режим программирования представлен в таблице 2.</p> <p><i>Таблица 2 – Температурно-временной режим амплификации</i></p> |              |                              |              |   |                |   |   |               |   |   |              |   |              |              |   |              |    |  |
|       | <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><tr><td>4</td><td>95 °C – 10 с</td><td>40</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 | 4 | 95 °C – 10 с | 40 |  |
| № 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           |                              |              |   |                |   |   |               |   |   |              |   |              |              |   |              |    |  |

|                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                          |  |              |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--------------|--|
|                                                                                                                | <table><tr><td>56 °C – 15 с, детекция HEX<sup>1</sup>, FAM<sup>2</sup>, ROX<sup>3</sup>, Cy5<sup>4</sup>, Cy5.5</td><td></td></tr><tr><td>72 °C – 15 с</td><td></td></tr></table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 56 °C – 15 с, детекция HEX <sup>1</sup> , FAM <sup>2</sup> , ROX <sup>3</sup> , Cy5 <sup>4</sup> , Cy5.5 |  | 72 °C – 15 с |  |
| 56 °C – 15 с, детекция HEX <sup>1</sup> , FAM <sup>2</sup> , ROX <sup>3</sup> , Cy5 <sup>4</sup> , Cy5.5       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                          |  |              |  |
| 72 °C – 15 с                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                          |  |              |  |
| После завершения программы амплификации отработанные пробирки утилизируют в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21. |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                          |  |              |  |
| 1.2.                                                                                                           | <p><b>Сбор (подготовка) образцов</b></p> <p><b>Выделение НК</b></p> <p>Предварительная подготовка</p> <ul style="list-style-type: none"><li>– При наличии в растворах 1-L-AUTO, и/или 3-W1-AUTO осадка необходимо прогреть растворы при температуре +60 °C до полного растворения осадка.</li><li>– Перед началом работы перелить раствор БП в пробирку с лиофилизованной Протеиназой К, тщательно перемешать, оставить на 5–10 минут. После этого еще раз тщательно перемешать и сбросить капли центрифугированием. Внимание!!! Готовый раствор Протеиназы К после приготовления хранить в морозильной камере при -20 °C.</li><li>– Тщательно ресуспендировать раствор 2-М, содержащий магнетизированный сорбент, на вортексе.</li><li>– На этапе выделения НК для внесения и добавления реагентов использовать наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.</li></ul> |                                                                                                          |  |              |  |
| 2.                                                                                                             | <b>ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                          |  |              |  |
| 2.1.                                                                                                           | <p><b>Экстракция НК</b></p> <p><b>Выделение НК комплектом НК-ex-AUTO-ИМБИАН</b></p> <p>1. Отобрать 5 глубоколоночных планшетов (либо 4 глубоколоночных планшета и 1 стандартный) и 1 глубоколоночный или стандартный планшет с гребенкой. Внести в лунки (количество лунок соответствует количеству исследуемых образцов) каждого планшета растворы в соответствии с таблицей 3.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                          |  |              |  |

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

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

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

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

Таблица 3 – Подготовка планшет

| Рабочий раствор                            | Подпись планшета | Тип планшета                        | Объем на лунку                            | Наименование планшета в приборе |
|--------------------------------------------|------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Гребенка наконечников</b>               | -                | С глубокими лунками/<br>Стандартный | Поместите гребенку наконечников в планшет | Tip Comb                        |
| <b>5-E</b>                                 | E                | С глубокими лунками/<br>Стандартный | 100,0 мкл                                 | Elution                         |
| <b>3-W1-AUTO</b>                           | W1               | С глубокими лунками                 | 300,0 мкл                                 | Wash Plate 1                    |
| <b>4-W2</b>                                | W21              | С глубокими лунками                 | 500,0 мкл                                 | Wash Plate 2                    |
| <b>4-W2</b>                                | W22              | С глубокими лунками                 | 500.0 мкл                                 | Wash Plate 3                    |
| <b>1L-AUTO+Раствор магномикса * +проба</b> | L                | С глубокими лунками                 | 750,0 мкл                                 | Lysis                           |

Рекомендуется заклеить приготовленные планшеты с растворами адгезивной фольгой или пленкой парафильм до загрузки в прибор для предотвращения контаминации растворов.

2. Подготовить раствор магномикса для внесения в планшет L:

– пробирки с Протеиназой К, ВКО1, и ОКВ осадить кратковременным центрифугированием.

– подготовить раствор магномикса:

○ в случае использования набора целиком, перелить содержимое пробирок с ВКО1, Протеиназой К и 2-М во флакон с раствором 1-L-AUTO. Закрыть флакон и перемешать содержимое. Внести в лунки планшета L по 750,0 мкл полученной смеси;

○ в случае использования набора не целиком, необходимо подготовить нужное количество раствора магномикса из расчета на одну точку выделения:

- 30,0 мкл раствора 2-М;
- 10,0 мкл раствора Протеиназы К;
- 10,0 мкл ВКО1 (из набора для амплификации, если используется).

Затем в лунки глубоколоночного планшета внести по 50,0 мкл полученной смеси и по 700,0 мкл 1-L-AUTO.

3. В лунки этого планшета внести по 100,0 мкл исследуемых проб (с пипетированием). В пробу для ОКВ необходимо внести 100 мкл ОКВ.

4. Установить планшеты в специально отведенное место в соответствии с протоколом. Протокол экстракции НК выбрать в соответствии с таблицей 4.

*Таблица 4 – Перечень протоколов для экстракции НК*

| Прибор                            | Протокол                |
|-----------------------------------|-------------------------|
| KingFisher™ Flex                  | Imbian_king_fisher_flex |
| KingFisher™ 96 MagMAX™ Express-96 |                         |
| Auto-Pure 96                      | Imbian_auto_pure        |

*Примечание – перед первым использованием протокол необходимо скачать с сайта [www.imbian.ru](http://www.imbian.ru) или запросить через почту [info@imbian.ru](mailto:info@imbian.ru) и установить в соответствии с инструкцией на сайте или в письме. В случае проблем с установкой обратиться на почту [info@imbian.ru](mailto:info@imbian.ru). При необходимости, после установки каждого планшета нажать кнопку «start» для подтверждения установки.*

5. По окончании процесса снять все планшеты в соответствии с протоколом. При необходимости, подтвердить снятие каждого планшета нажатием кнопки «start». Следует иметь в виду, что планшет L должен сниматься первым. По окончании цикла нажмите кнопку «stop».

*Надосадочная жидкость содержит очищенные НК. Пробы готовы к переносу в пробирки, не содержащие ДНКаз и РНКаз и постановке реакции ОТ и ПЦР.*

6. При необходимости, перенести надосадочную жидкость, не захватывая сорбент (не более 90,0 мкл), в промаркированные пробирки, не содержащие ДНКаз и РНКаз, объемом не менее 0,2 мл.

Выделенную НК можно хранить несколько часов при температуре от +2 °С до +8 °С или в течение года при температуре не выше -68 °С.

**2.2. Выделение НК с использованием магнитного штатива комплектом НК-ex-AUTO-ИМБИАН**

1. Отобрать и, при необходимости, промаркировать нужное количество одноразовых пробирок, объемом не менее 1,5 мл с плотно

\* Раствор магномикса следует подготовить руководствуясь описанием ниже.

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p>закрывающимися крышками. Количество пробирок будет равно количеству проб + ОКВ.</p> <p>2. Пробирки с Протеиназой К, ВКО1, и ОКВ осадить кратковременным центрифугированием в течение 2–5 секунд.</p> <p>3. Подготовить раствор магномикса:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ в случае использования набора целиком, перелить содержимое пробирок с ВКО1, Протеиназой К и 2-М во флакон с раствором 1-L-AUTO. Закрыть флакон и перемешать содержимое. Внести в пробирки, совместимые с магнитным штативом по 750,0 мкл полученной смеси;</li> <li>○ в случае использования набора не целиком, необходимо подготовить нужное количество раствора магномикса из расчета на одну точку выделения:</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 30,0 мкл раствора 2-М;</li> <li>· 10,0 мкл раствора Протеиназы К;</li> <li>· 10,0 мкл ВКО1 (из набора для амплификации, если используется).</li> </ul> <p>Затем в отдельные пробирки, совместимые с магнитным штативом, внести по 50,0 мкл полученной смеси и по 700,0 мкл 1-L-AUTO.</p> <p>4. В каждую пробирку с раствором 1-L-AUTO и ВКО1 внести по 100,0 мкл подготовленных проб. В пробирку отрицательного контроля выделения (ОКВ) внести 100,0 мкл ОКВ.</p> <p>5. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе (без вспенивания). Поместить при 60 °С на 5 минут в термостат, периодически встряхивая на вортексе.</p> <p>6. Процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и поместить пробирки в магнитный штатив. Подождать, пока магнитные частицы полностью перейдут в осадок. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.</p> <p>7. Добавить 300,0 мкл раствора 3-W1-AUTO, тщательно перемешать на вортексе в течение 2–5 секунд или пипетированием в течение 2–5 секунд.</p> <p>8. Поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.</p> <p>9. Добавить 500,0 мкл раствора 4-W2, тщательно перемешать на вортексе в течение 2–5 секунд или пипетированием в течение 2–5 секунд.</p> |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | <p>10. Поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц удалить супернатант.</p> <p>11. Добавить 500,0 мкл раствора 4-W2, тщательно перемешать на вортексе в течение 2–5 секунд или пипетированием в течение 2–5 секунд.</p> <p>12. Поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц удалить супернатант.</p> <p>13. Поместить пробирки в термостат при температуре 60°C на 5–10 минут для подсушивания осадка (крышки пробирок должны быть открыты!).</p> <p>14. Добавить 100,0 мкл раствора 5-E, тщательно перемешать на вортексе в течение 2–5 секунд или пипетированием в течение 2–5 секунд.</p> <p>15. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре (от +15°C до +25 C).</p> <p>16. Поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц супернатант содержит выделенную геномную НК.</p> <p>17. При необходимости, перенести надосадочную жидкость (не более 90,0 мкл) в новую чистую пробирку, не содержащую ДНКаз и РНКаз.</p>                                |
| 2.3. | <p><b><i>Этапы проведения амплификации</i></b></p> <p><b><i>Подготовка реакционной смеси</i></b></p> <p>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. Промаркировать пробирки.</p> <p>2. После этого последовательно внести:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) – 30,0 мкл ОКО;</li> <li>○ в ряд пробирок для исследуемых проб – в каждую внести по 30,0 мкл НК соответствующей пробы (включая пробу ОКВ);</li> <li>○ в пробирку с положительным контролем ПЦР (К+) – 30,0 мкл ПКО Грипп ABSH1.</li> </ul> <p><b><i>Примечания:</i></b></p> <p>1. при внесении проб в пробирки, необходимо 3–4 раза пипетировать вносимую пробу;</p> <p>2. при необходимости сбросить капли со стенок пробирок с помощью вортекса или вручную.</p> <p>3. Заклеить стрипы оптической плёнкой.</p> |

|                   | Внимание! Не рекомендуется наносить на оптическую пленку какие-либо надписи. Вы можете зафиксировать наименования проб на матрице образцов.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |              |                                |                   |                                                       |       |                                                                                                                                                                                             |               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.                | <b>УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |              |                                |                   |                                                       |       |                                                                                                                                                                                             |               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 3.1.              | <p><b><i>Первичная обработка данных</i></b></p> <p>Перед началом анализа полученных результатов необходимо провести первичную обработку полученных данных. для этого необходимо применить настройки, указанные в таблице 5.</p> <p><i>Таблица 5 – Первичная обработка полученных данных</i></p> <table><tr><th>Амплификатор</th><th>Настройки для обработки данных</th></tr><tr><td>ДТ-96,<br/>ДТпрайм</td><td>Тип анализа «Мультиплекс»<br/>Метод – «Пороговый (Ct)»</td></tr><tr><td>CFX96</td><td>Режим анализа данных Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted Curve Fit (установлен по умолчанию)<br/>Baseline Threshold – на уровне 10–20 % от максимального уровня флуоресценции образца K+</td></tr><tr><td>QuantStudio 5</td><td>Критерий оценки формы графика амплификации заменить на оценку статуса амплификации по каждому каналу:<br/>Отметка «Amp» в столбце «Amp Status» соответствует оценке S-образной формы графика амплификации по анализируемому каналу детекции флуоресценции. Результат учитывается согласно таблицам 6-7.<br/>Отметка «No Amp» в столбце «Amp Status» соответствует оценке неправильной, линейной форме графика амплификации по анализируемому каналу детекции флуоресценции.<br/>Амплификация с обозначением «No Amp» должна учитываться как отрицательная по анализируемому каналу детекции флуоресценции.<br/>Пробы с отметкой «Inconclusive» учитываются также как и пробы с отметкой «Amp».</td></tr></table> | Амплификатор | Настройки для обработки данных | ДТ-96,<br>ДТпрайм | Тип анализа «Мультиплекс»<br>Метод – «Пороговый (Ct)» | CFX96 | Режим анализа данных Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted Curve Fit (установлен по умолчанию)<br>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:<br>Отметка «Amp» в столбце «Amp Status» соответствует оценке S-образной формы графика амплификации по анализируемому каналу детекции флуоресценции. Результат учитывается согласно таблицам 6-7.<br>Отметка «No Amp» в столбце «Amp Status» соответствует оценке неправильной, линейной форме графика амплификации по анализируемому каналу детекции флуоресценции.<br>Амплификация с обозначением «No Amp» должна учитываться как отрицательная по анализируемому каналу детекции флуоресценции.<br>Пробы с отметкой «Inconclusive» учитываются также как и пробы с отметкой «Amp». |
| Амплификатор      | Настройки для обработки данных                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |              |                                |                   |                                                       |       |                                                                                                                                                                                             |               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| ДТ-96,<br>ДТпрайм | Тип анализа «Мультиплекс»<br>Метод – «Пороговый (Ct)»                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |              |                                |                   |                                                       |       |                                                                                                                                                                                             |               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| CFX96             | Режим анализа данных Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted Curve Fit (установлен по умолчанию)<br>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:<br>Отметка «Amp» в столбце «Amp Status» соответствует оценке S-образной формы графика амплификации по анализируемому каналу детекции флуоресценции. Результат учитывается согласно таблицам 6-7.<br>Отметка «No Amp» в столбце «Amp Status» соответствует оценке неправильной, линейной форме графика амплификации по анализируемому каналу детекции флуоресценции.<br>Амплификация с обозначением «No Amp» должна учитываться как отрицательная по анализируемому каналу детекции флуоресценции.<br>Пробы с отметкой «Inconclusive» учитываются также как и пробы с отметкой «Amp».                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |              |                                |                   |                                                       |       |                                                                                                                                                                                             |               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

| 3.2.     | <p><b><i>Анализ результатов</i></b></p> <p>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).</p> <p><u>Оценка валидности результатов и анализ результатов исследования</u></p> <p>Перед началом анализа следует оценить прохождение контролей в ОКВ, ОКО и ПКО в соответствии с таблицей 6.</p> <p>Сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– НК гриппа А (Influenza A virus) регистрируется по каналу для флуорофора ROX;</li> <li>– НК пандемического субтипа H1pdm09 гриппа А регистрируется по каналу для флуорофора Cy5;</li> <li>– НК гриппа В (Influenza B virus) регистрируется по каналу для флуорофора Cy5.5;</li> <li>– НК коронавируса SARS-CoV-2 детектируется по каналу для флуорофора FAM;</li> <li>– НК ВКО1 детектируется по каналу для флуорофора HEX.</li> </ul> <p>Результат ПЦР-анализа считать достоверным, если значения Ct для контролей амплификации лежат в пределах нормы (этап успешно пройден).</p> <p><i>Таблица 6 – Оценка контролей ОТ ПЦР РВ</i></p> <table> <tr> <th rowspan="2">Контроль</th><th colspan="5">Диапазон Ct по каналу</th><th rowspan="2">Результат</th></tr> <tr> <th>HEX<br/>ВКО1</th><th>FAM<br/>SARS-<br/>CoV-2</th><th>ROX<br/>Грипп А</th><th>Cy5<br/>H1pdm09</th><th>Cy5.5<br/>Грипп В</th></tr> <tr> <td rowspan="2">ОКВ</td><td>Значение &lt; 28</td><td colspan="4">Нет значений либо значения &gt;35.</td><td>Норма. Экстракция прошла успешно.</td></tr> <tr> <td>Значение ≥ 28</td><td colspan="4">Значение ≤ 35 по одному или нескольким каналам.</td><td>Результат невалидный. Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка!</td></tr> </table> |                                                 |                |                |                  |                                                                                   | Контроль | Диапазон Ct по каналу |  |  |  |  | Результат | HEX<br>ВКО1 | FAM<br>SARS-<br>CoV-2 | ROX<br>Грипп А | Cy5<br>H1pdm09 | Cy5.5<br>Грипп 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! |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------|----------------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------------------|--|--|--|--|-----------|-------------|-----------------------|----------------|----------------|------------------|-----|---------------|---------------------------------|--|--|--|-----------------------------------|---------------|-------------------------------------------------|--|--|--|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Контроль | Диапазон Ct по каналу                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                 |                |                |                  | Результат                                                                         |          |                       |  |  |  |  |           |             |                       |                |                |                  |     |               |                                 |  |  |  |                                   |               |                                                 |  |  |  |                                                                                   |
|          | HEX<br>ВКО1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | FAM<br>SARS-<br>CoV-2                           | ROX<br>Грипп А | Cy5<br>H1pdm09 | Cy5.5<br>Грипп 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! |          |                       |  |  |  |  |           |             |                       |                |                |                  |     |               |                                 |  |  |  |                                   |               |                                                 |  |  |  |                                                                                   |



|                                |                                                                                                                |                                                                                          |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ОКО</b>                     | Нет значений, либо значения >35.                                                                               | Норма. ОТ и ПЦР прошла успешно.                                                          |
|                                | Значение $\leq 35$ по одному или нескольким каналам.                                                           | Результат невалидный. Специфическая контаминация! <b>ТРЕБУЕТСЯ</b> повторная постановка! |
| <b>ПКО<br/>Грипп<br/>ABSH1</b> | Значение от 1 до 35.                                                                                           | Норма. ОТ и ПЦР прошла успешно.                                                          |
|                                | Значение по одному или нескольким каналам $\geq 35$ 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 7.

*Таблица 7 – Анализ результатов исследования*

| №<br>п/п | Результат                                                                                                                                   | Интерпретация                                                         |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 1.       | Значение Ct по каналу для флуорофора HEX (ВКО1) отсутствует или определено $\geq 28$ 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 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |

