

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 LF2

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
LF2	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 °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 HEX¹, FAM², ROX³, Cy5⁴, Cy5.5</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		72 °C – 15 с
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 пробирок с лиофилизированной готовой реакционной смесью. 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 ПКО ABSH1. <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.	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. <i>Таблица 3 – Первичная обработка полученных данных</i> <table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="173 276 359 320">Амплификатор</th><th data-bbox="359 276 1041 320">Настройки для обработки данных</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="173 320 359 448">Rotor-Gene Q</td><td data-bbox="359 320 1041 448"> «Dynamic tube»/«Динамич. фон» «Slope Correct»/«Коррект. уклона» «Outlier Removal»/«Устранение выбросов» – 10 % Threshold – 0,05 </td></tr> <tr> <td data-bbox="173 448 359 523">ДТ-96, ДТпрайм</td><td data-bbox="359 448 1041 523"> Тип анализа «Мультиплекс». Метод – «Пороговый (Ct)». </td></tr> <tr> <td data-bbox="173 523 359 651">CFX96</td><td data-bbox="359 523 1041 651"> 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+. </td></tr> <tr> <td data-bbox="173 651 359 1054">QuantStudio 5</td><td data-bbox="359 651 1041 1054"> 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». </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 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».
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 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 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 < 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	Значение от 1 до 35.					Норма. ОТ и ПЦР прошла

Грипп ABSH1		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.	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												

