

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+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
LF2+Auto	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 3. <i>Таблица 3 – 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></td></tr><tr><td>72 °C – 15 с</td><td></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.					
1.2.	Сбор (подготовка) образцов Выделение НК Предварительная подготовка – При наличии в растворах 1-L-AUTO, и/или 3-W1-AUTO осадка необходимо прогреть растворы при температуре +60 °C до полного растворения осадка. – 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. – Тщательно ресуспендировать раствор 2-М, содержащий магнетизированный сорбент, на вортексе для комплекта НК-ex-AUTO-ИМБИАН. – На этапе выделения НК для внесения и добавления реагентов использовать наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.					
2.	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА					
2.1.	Экстракция НК Выделение НК комплектом НК-ex-AUTO-ИМБИАН 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. <i>Таблица 3 – Подготовка планшет</i> <table><tr><td>Рабочий раствор</td><td>Подпись</td><td>Тип</td><td>Объем на лунку</td><td>Наименование</td></tr></table>	Рабочий раствор	Подпись	Тип	Объем на лунку	Наименование
Рабочий раствор	Подпись	Тип	Объем на лунку	Наименование		

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.

	планшета	планшета		планшета в приборе
Гребенка наконечников	-	С глубокими лунками/ Стандартный	Поместите гребенку наконечников в планшет	Tip Comb
5-E	E	С глубокими лунками/ Стандартный	100,0 мкл	Elution
3-W1-AUTO	W1	С глубокими лунками	300,0 мкл	Wash Plate 1
4-W2	W21	С глубокими лунками	500,0 мкл	Wash Plate 2
4-W2	W22	С глубокими лунками	500,0 мкл	Wash Plate 3
1L-AUTO + Раствор магномикса * + проба	L	С глубокими лунками	750,0 мкл	Lysis

Рекомендуется заклеить приготовленные планшеты с растворами адгезивной фольгой или пленкой парафилм 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).

* Раствор магномикса следует подготовить руководствуясь описанием ниже.

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 или запросить через почту 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. 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.

Экстракция НК с использованием магнитного штатива

1. Отобрать и, при необходимости, промаркировать нужное количество одноразовых пробирок, объемом не менее 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками. Количество пробирок будет равно количеству проб + ОКВ.

2. Пробирки с Протеиназой К, ВКО1, и ОКВ осадить кратковременным центрифугированием в течение 2–5 секунд.

3. 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 пробирки, совместимые с магнитным штативом 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 отдельные пробирки, совместимые с магнитным штативом, внести по 50,0 мкл полученной смеси и по 700,0 мкл 1-L-AUTO. 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. 5. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе (без вспенивания). Поместить при 60 °С на 5 минут в термостат, периодически встряхивая на вортексе. 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. 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. 8. Поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками. 9. Добавить 500,0 мкл раствора 4-W2, тщательно перемешать на вортексе в течение 2–5 секунд или пипетированием в течение 2–5 секунд. 10. Поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц удалить супернатант. 11. Добавить 500,0 мкл раствора 4-W2, тщательно перемешать на вортексе в течение 2–5 секунд или пипетированием в течение 2–5 секунд. 12. Поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц удалить супернатант.
--	--

	13. Поместить пробирки в термостат при температуре 60°C на 5-10 минут для подсушивания осадка (крышки пробирок должны быть открыты!). 14. Добавить 100,0 мкл раствора 5-Е, тщательно перемешать на вортексе в течение 2–5 секунд или пипетированием в течение 2–5 секунд. 15. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре (от +15 °C до +25 °C). 16. Поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц супернатант содержит выделенную геномную НК. 17. При необходимости, перенести надосадочную жидкость (не более 90,0 мкл) в новую чистую пробирку, не содержащую ДНКаз и РНКаз.
2.3.	<i>Этапы проведения амплификации</i> Подготовка реакционной смеси 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 Грипп ABSN1. <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

3.1.	<i>Первичная обработка данных</i> Перед началом анализа полученных результатов необходимо провести первичную обработку полученных данных. для этого необходимо применить настройки, указанные в таблице 5. <i>Таблица 5 – Первичная обработка полученных данных</i> <table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="176 276 362 316">Амплификатор</th><th data-bbox="362 276 1039 316">Настройки для обработки данных</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="176 316 362 448">Rotor-Gene Q</td><td data-bbox="362 316 1039 448"> «Dynamic tube»/«Динамич. фон» «Slope Correct»/«Коррект. уклона» «Outlier Removal»/«Устранение выбросов» – 10 % Threshold – 0,05 </td></tr> <tr> <td data-bbox="176 448 362 523">ДТ-96, ДТпрайм</td><td data-bbox="362 448 1039 523"> Тип анализа «Мультиплекс». Метод – «Пороговый (Ct)». </td></tr> <tr> <td data-bbox="176 523 362 651">CFX96</td><td data-bbox="362 523 1039 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="176 651 362 1054">QuantStudio 5</td><td data-bbox="362 651 1039 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 6-7. 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 6-7. 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 6-7. 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.	<i>Анализ результатов</i> 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). <u>Оценка валидности результатов и анализ результатов исследования</u>										

Перед началом анализа следует оценить прохождение контролей в ОКВ, ОКО и ПКО Грипп ABSH1 в соответствии с таблицей 6.

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 6 – 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 Грипп	Значение от 1 до 35.					Норма. ОТ и ПЦР прошла успешно.

ABSH1	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 7.

Таблица 7 – 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.	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												

