

Вкладыш в инструкцию

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

Вариант исполнения Standard+

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

Таблица 1 – Амплификаторы для анализа

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

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

1.	ПОДГОТОВКА К ИССЛЕДОВАНИЮ		
1.1.	Условия проведения анализа		
	Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки амплификатора. Запрограммировать прибор согласно инструкции производителя.		
	В случае возникновения трудностей с программированием прибора рекомендуем обратиться за помощью к специалисту компании ООО «ИМБИАН ЛАБ».		
	Скачать файлы с готовыми параметрами тестов можно с сайта www.imbian.ru или запросить через почту info@imbian.ru , и установить в соответствии с инструкцией на сайте или в письме. Режим программирования представлен в таблице 2.		
	<i>Таблица 2 – Температурно-временной режим амплификации</i>		
	№ 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, Cy5.5⁵</td><td rowspan="2"></td></tr><tr><td>72 °C – 15 с</td></tr></table>	56 °C – 15 с, детекция HEX ¹ , FAM ² , ROX ³ , Cy5 ⁴ , Cy5.5 ⁵		72 °C – 15 с
56 °C – 15 с, детекция HEX ¹ , FAM ² , ROX ³ , Cy5 ⁴ , Cy5.5 ⁵				
72 °C – 15 с				
	После завершения программы амплификации отработанные пробирки утилизируют в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.			
1.2.	<i>Сбор (подготовка) образцов</i> <i>Выделение НК</i> Предварительная подготовка – При наличии в растворах 1-L и/или 3-W1 осадка, необходимо прогреть растворы при температуре +60 °C до полного растворения осадка. – Тщательно ресуспендировать 2-CY, содержащий сорбент универсальный, на вортексе. – На этапе выделения НК для внесения и добавления реагентов использовать наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.			
2.	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА			
2.1.	<i>Выделение НК комплектом НК-ex-ИМБИАН</i> 1. Отобрать и, при необходимости, промаркировать нужное количество одноразовых пробирок объёмом не менее 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками. Количество пробирок будет равно количеству проб + ОКВ. 2. Внести в каждую пробирку по 10,0 мкл ВКО1. Добавить в каждую пробирку по 700,0 мкл раствора 1-L. 3. В каждую пробирку с раствором 1-L и ВКО1 внести по 100,0 мкл подготовленных проб. В пробирку отрицательного контроля (ОКВ) выделения внести 100,0 мкл ОКВ. 4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе в течение 2–5 секунд (без вспенивания), процентрифугировать в течение 5 секунд на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть 5 минут при +60 °C в термостате.			

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

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

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

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

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

5. В каждую пробирку добавить по 30,0 мкл ресуспендированного 2-СУ. Перемешать на вортексе в течение 2–5 секунд (без вспенивания), оставить на столе на 5 минут. Каждые 2 минуты пробирки встряхивать на вортексе в течение 2–5 секунд (без вспенивания).

6. Осадить 2-СУ в пробирках центрифугированием при 12000 об/мин в течение 1 минуты. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

7. Добавить в каждую пробирку по 300,0 мкл раствора для отмывки 3-W1. Перемешать на вортексе в течение 2–5 секунд (без вспенивания) до получения однородной суспензии.

8. Осадить 2-СУ центрифугированием при 12000 об/мин в течение 1 минуты. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

9. Добавить в пробирки по 500,0 мкл раствора для отмывки 4-W2. Перемешать на вортексе в течение 2–5 секунд до получения однородной суспензии.

10. Осадить 2-СУ центрифугированием при 12000 об/мин в течение 1 минуты. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

11. Добавить в пробирки по 500,0 мкл раствора для отмывки 4-W2. Перемешать на вортексе в течение 2–5 секунд до получения однородной суспензии.

12. Осадить 2-СУ центрифугированием при 12000 об/мин в течение 1 минуты. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

13. Поместить пробирки в термостат при температуре +60 °C на 5 – 15 минут для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты). Убедиться, что содержимое пробирок полностью высохло.

14. Добавить в каждую пробирку по 100,0 мкл раствора 5-E. Перемешать на вортексе в течение 2 – 5 секунд.

15. Поместить в термостат при температуре +60 °C на 5 минут, периодически (каждые 2 минуты) встряхивая на вортексе.

16. Процентрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 минуты на микроцентрифуге.

Надосадочная жидкость содержит очищенные НК.

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.

	Очищенная НК может храниться до 24 ч при температуре от +2 °С до +8 °С и до года при температуре не выше -16 °С.
2.2.	<i>Этапы проведения амплификации</i> <i>Подготовка этапа амплификации</i> 1. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ ПЦР в РВ. Допускается размораживание реагентов из набора перед работой при температуре не выше +45 °С (с использованием термостата). 2. Пробирку с Разбавителем нельзя греть в термостате! Разбавитель необходимо размораживать при температуре от +15 °С до +25 °С до полной разморозки. <i>Примечание – перед запуском эксперимента прогреть прибор CFХ не менее 15 мин (если используется)</i> <i>Внимание! При использовании амплификаторов со считыванием через крышку (например, ДТ-96), запрещается наносить маркировку на крышку пробирок!</i>
2.3.	<i>Подготовка реакционной смеси</i> Общий объем реакционной смеси – 30,0 мкл, объем НК-пробы – 10,0 мкл. 1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл, исходя из количества выделенных проб (включая ОКВ) плюс положительный и отрицательный контроли для проведения ОТ и ПЦР. Промаркировать пробирки. 2. В отдельной одноразовой пробирке смешать компоненты набора из расчета на каждую реакцию: ○ ПЦР-Смесь Грипп ABSH1 – 10,0 мкл; ○ Разбавитель – 10,0 мкл. 3. Перемешать смесь на вортексе в течение 2–5 секунд и сбросить капли кратковременным центрифугированием (2–5 секунд). Постараться не допускать вспенивания реакционной смеси. 4. В приготовленные пробирки для ОТ и ПЦР внести по 20,0 мкл реакционной смеси. 5. После этого последовательно внести: ○ в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) – 10,0 мкл ОКО; ○ в ряд пробирок для исследуемых проб – в каждую внести по 10,0 мкл НК соответствующей пробы (включая пробу ОКВ); ○ в пробирку с положительным контролем ПЦР (К+) – 10,0 мкл ПКО Грипп ABSH1.

	<i>Примечание – при работе с амплификаторами планшетного типа сбросить капли со стенок пробирок с помощью вортекса.</i>											
3.	УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ											
3.1.	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><tr><th>Амплификатор</th><th>Настройки для обработки данных</th></tr><tr><td>Rotor-Gene Q</td><td>«Dynamic tube»/«Динамич. фон» «Slope Correct»/«Коррект. уклона» «Outlier Removal»/«Устранение выбросов» – 10 % Threshold – 0,05</td></tr><tr><td>ДТ-96, ДТпрайм</td><td>Тип анализа «Мультиплекс». Метод – «Пороговый (Ct)».</td></tr><tr><td>CFX96</td><td>Режим анализа данных Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted Curve Fit (установлен по умолчанию). Baseline Threshold – на уровне 10–20 % от максимального уровня флуоресценции образца K+.</td></tr><tr><td>QuantStudio 5</td><td>Критерий оценки формы графика амплификации заменить на оценку статуса амплификации по каждому каналу: Отметка «Amp» в столбце «Amp Status» соответствует оценке S-образной формы графика амплификации по анализируемому каналу детекции флуоресценции. Результат учитывается согласно таблицам 4–5. 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></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

Контр оль	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 ABSH1	Значение от 1 до 35.	Норма. ОТ и ПЦР прошла успешно.
	Значение по одному или нескольким каналам ≥ 35 или отсутствует значение по одному или нескольким каналам.	Результат невалидный, требуется перестановка.

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

Таблица 5 – Анализ результатов исследования

№ п / п	Результат	Интерпретация
1.	Значение C_t по каналу для флуорофора HEX (ВКО1) отсутствует или определено ≥ 28 при этом значения C_t по остальным каналам отсутствуют.	Невалидный! Сбой ВКО1! Требуется повторить анализ с этапа экстракции.
2.	Значения C_t по каналам для флуорофоров FAM определены выше 35, при этом значение C_t по каналу для флуорофора HEX определено не выше 28.	НК SARS-CoV-2 не обнаружена.
3.	Значения C_t по каналам для флуорофоров ROX определены выше 35, при этом значение C_t по каналу для флуорофора HEX определено не выше 28.	НК Influenza virus A не обнаружена.
4.	Значения C_t по каналам для флуорофоров ROX и Cy5 определены выше 35, при этом значение C_t 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.	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												

