

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «ИМБИАН ЛАБ»

/В.В. Осипова/

«28» июня 2024 г.

М.П.



Инструкция по применению медицинского изделия для диагностики in vitro

**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**

ВВЕДЕНА ВПЕРВЫЕ

REF

КР-007



Для 96, 100 определений



ООО «ИМБИАН ЛАБ», 630559, Россия, Новосибирская область, г.о. рабочий поселок Кольцово,
р.п. Кольцово, ул. Садовая, д. 2/7, этаж 2, помещ. 2
+7 (383) 209-34-54
info@imbian.ru
www.imbian.ru

ВВЕДЕНИЕ

Настоящая инструкция по применению распространяется на медицинское изделие «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 (далее набор реагентов, «Грипп-А/H1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», набор, изделие). Варианты исполнения приведены в приложении к настоящей инструкции по применению.

Сокращенное наименование

Грипп-А/H1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР.

Назначение изделия

Набор предназначен для качественного дифференциального выявления РНК вирусов гриппа А с дифференциацией пандемического субтипа H1pdm09 гриппа А, гриппа В и коронавируса SARS-CoV-2 (включая альфа, бета, гамма, дельта, омикрон, лямбда) в биологическом материале (мазки из носоглотки и ротоглотки, мокрота, эндотрахеальный аспират из трахеи, БАЛ (бронхоальвеолярный лаваж) методом совмещенной реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ и ПЦР) в режиме реального времени (РВ).

Предназначен для диагностики *in vitro* при профессиональном применении как вспомогательное средство для выявления и дифференциальной диагностики инфекций, вызываемых вирусами гриппа А (позволяет дифференцировать пандемический субтип H1pdm09), В и SARS-CoV-2, для всех групп населения.

Популяционно-демографические особенности

Набор реагентов не имеет никаких демографических или популяционных ограничений. Может использоваться для всех возрастных групп, вне зависимости от пола.

Функциональное назначение

Набор реагентов «Грипп-А/H1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР» предназначен для диагностики *in vitro* при профессиональном применении как вспомогательное средство для выявления и дифференциальной диагностики инфекций, вызываемых вирусами гриппа А (позволяет дифференцировать пандемический субтип H1pdm09), В и SARS-CoV-2, для всех групп населения.

Показания

Набор реагентов «Грипп-Скрин+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР» рекомендуется применять при дифференциальной диагностике инфекции, вызванной вирусами гриппа А, В, и инфекции COVID-19 у лиц с клинической симптоматикой респираторного заболевания, а также с подозрением на грипп или COVID-19, или при скрининге населения на вирусоносительство методом ОТ-ПЦР РВ.

Противопоказания

Противопоказано использование набора реагентов с истекшим сроком годности.

Противопоказано использование набора реагентов при несоблюдении условий хранения, транспортирования и инструкции по применению.

Побочные эффекты

Отсутствуют.

Потенциальные потребители изделия

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике специально обученным персоналом, прошедшим соответствующую профессиональную подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе

с патогенными для человека микроорганизмами и прошедшим соответствующую профессиональную подготовку в области молекулярно-биологических методов работы.

Профессиональный уровень потенциальных потребителей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник, лаборант.

Область применения

Клиническая лабораторная диагностика *in vitro*.

Перечень и описание материалов медицинского изделия, вступающих в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента (телом человека)

Отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента.

Перечень материалов животного и (или) человеческого происхождения, лекарственных средств и фармацевтических субстанций

Отсутствуют материалы человеческого происхождения, лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Ограничения методики исследования

Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

Только для профессионального использования.

Не допускается смешивание наборов реагентов разных серий.

В работе необходимо использовать компоненты строго из одной серии набора реагентов. Запрещается использование отдельных компонентов, относящихся к разным сериям Набора реагентов.

Избегать образования пены во всех реагентах и образцах.

Не использовать набор после истечения срока годности, указанного на упаковке.

Экстракцию РНК из анализируемых проб необходимо осуществлять с использованием внутреннего контрольного образца – ВКО, входящим в состав набора. Его использование позволяет оценить успешность процесса экстракции в каждой пробирке. При исследованиях без внутреннего контрольного образца увеличивается возможность получения ложноотрицательных результатов.

Наличие контаминации может привести к ложноположительным результатам. Следует использовать отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора, чтобы иметь возможность вовремя выявить и устранить контаминацию.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов клинического материала.

При возникновении мутаций в исследуемой области генов, может снижаться интенсивность анализируемого сигнала или возникать ложноотрицательные реакции.

Во избежание ложноположительных результатов исследования следует проводить не ранее чем через месяц после вакцинации живыми вакцинами.

Применять набор реагентов строго по назначению.

Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

Избегать контакта содержимого набора реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не открывать пробирки после амплификации, чтобы избежать контаминации в лаборатории.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке СанПиН 2.1.3684-21.

Методы стерилизации и дезинфекции изделия

Изделие нестерильно, не требует стерилизации и дезинфекции.

Кратность применения медицинского изделия

Изделие предназначено для однократного применения по назначению.

Программное обеспечение работы изделия

Отсутствует.

Техническое обслуживание и ремонт изделия

Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ

Комплектность

Набор выпускается в 9 вариантах исполнения. Варианты исполнения наборов представлены в таблице 1.

Комплектность каждого варианта исполнения представлена в таблицах 2-10.

Варианты исполнения Standard, LF1, LF2 не включают реагенты для выделения НК.

Варианты исполнения Standard +, LF1 +, LF2 + включают реагенты для выделения НК не предназначенные для автоматического выделения.

Варианты Standard+Auto, LF1+Auto, LF2+Auto включают реагенты для автоматического выделения НК либо с использованием магнитного штатива.

Варианты исполнения Standard (Standard, Standard +, Standard + Auto), включают смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом не менее 1,5 мл. Можно использовать для работы на амплификаторах как роторного, так и планшетного типа. Рассчитаны на проведение 100 исследований, включая контроли.

Варианты исполнения LF1 (LF1, LF1 +, LF1+Auto) включают готовую лиофилизированную ПЦР-смесь в стрипах для проведения ПЦР. Можно использовать для работы на амплификаторах планшетного типа. Рассчитаны на проведение 96 исследований, включая контроли.

Варианты исполнения LF2 (LF2, LF2+, LF2+Auto) включают готовую лиофилизированную ПЦР-смесь в пробирках типа эппендорф объемом 0,2 мл. Можно использовать для работы на амплификаторах как роторного, так и планшетного типа. Рассчитаны на проведение 100 исследований, включая контроли.

Таблица 1. Варианты исполнения набора

Вариант исполнения	Состав	Описание	Кол-во определений
Standard	• «Base kit 1 – комплект для совместного	Смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом не менее 1,5 мл для дозирования в любые типы пробирок. Можно использовать	100

	проведения реакций ОТ и ПЦР	для работы на амплификаторах как роторного, так и планшетного типа. Реактивы для экстракции НК в состав не входят.	
Standard+	«Base kit 1 – комплект для совместного проведения реакций ОТ и ПЦР «НК-ех-ИМБИАН» – комплект для выделения НК.	Смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом не менее 1,5 мл для дозирования в любые типы пробирок. Можно использовать для работы на амплификаторах как роторного, так и планшетного типа. В комплектацию входят реактивы для экстракции НК.	100
Standard+ Auto	- Base kit 1 – комплект для совместного проведения реакций ОТ и ПЦР - НК-ех-AUTO-ИМБИАН – комплект для автоматического выделения НК.	Смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом не менее 1,5 мл для дозирования в любые типы пробирок. Можно использовать для работы на амплификаторах как роторного, так и планшетного типа. В комплектацию входят реактивы для экстракции НК на автоматизированных станциях выделения (например, KingFisher Flex).	100
LF1	«Base kit 2 – комплект для совместного проведения реакций ОТ и ПЦР	Смесь для проведения ПЦР лиофилизирована в стрипах для проведения ПЦР. Можно использовать для работы на амплификаторах планшетного типа. Реактивы для экстракции НК в состав не входят.	96
LF1+	- Base kit 2 – комплект для совместного проведения реакций ОТ и ПЦР «НК-ех-Имбиан» – комплект для выделения НК.	Смесь для проведения ПЦР лиофилизирована в стрипах для проведения ПЦР. Можно использовать для работы на амплификаторах планшетного типа. В состав варианта исполнения входят реактивы для экстракции НК.	96
LF1+Auto	«Base kit 2 – комплект для совместного проведения реакций «НК-ех-AUTO-ИМБИАН» – комплект для автоматического выделения НК.	Смесь для проведения ПЦР лиофилизирована в стрипах для проведения ПЦР. Можно использовать для работы на амплификаторах планшетного типа. В состав варианта исполнения входят реактивы для экстракции НК на автоматизированных станциях выделения (например, KingFisher Flex).	96
LF2	Base kit 3 – комплект для совместного проведения реакций	Смесь для проведения ПЦР лиофилизирована в пробирках типа эппендорф объемом 0,2 мл для проведения ПЦР. Можно использовать для работы на амплификаторах как роторного, так и планшетного типа. Реактивы для экстракции НК в состав не входят.	100

LF2+	• Base kit 3 – комплект для совместного проведения реакций • «НК-ех-ИМБИАН» – комплект для выделения НК	Смесь для проведения ПЦР лиофилизирована в пробирках типа эппендорф объемом 0,2 мл для проведения ПЦР. Можно использовать для работы на амплификаторах как роторного, так и планшетного типа В вариант исполнения входят реагенты для экстракции НК.	100
LF2+Auto	• Base kit 3 – комплект для совместного проведения реакций • «НК-ех-AUTO-ИМБИАН» – комплект для автоматического выделения НК.	Смесь для проведения ПЦР лиофилизирована в пробирках типа эппендорф объемом 0,2 мл для проведения ПЦР. Можно использовать для работы на амплификаторах как роторного, так и планшетного типа. В вариант исполнения входят реагенты для экстракции НК на автоматизированных станциях выделения (например, KingFisher Flex).	100

Комплектность вариантов исполнения представлена в таблицах 2-10.

В таблице 2 представлена комплектация варианта исполнения Standard. Реактивы для экстракции НК в состав не входит.

Таблица 2. Комплектация набора «Грипп-А/H1pdm09+B+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», Standard

Наименование	Расшифровка	Объем, мл	Описание	Количество
Комплект Base kit 1				
ПЦР-Смесь Грипп ABSH1	Смесь для проведения ОТ и ПЦР	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь розоватый или синеватый оттенок	1 пробирка
Разбавитель	Буфер для проведения ОТ и ПЦР	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ОКО	Отрицательный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ВКО1	Внутренний контрольный образец этапа выделения НК	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ОКВ	Отрицательный контрольный образец этапа выделения НК	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ПКО Грипп ABSH1	Положительный контрольный	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка

	образец этапа ОТ и ПЦР			
Паспорт качества ¹				1 шт
Инструкция по применению ¹				1 шт
Вкладыш в инструкцию ¹				1 шт

Комплектация варианта исполнения Standard+ представлена в таблице 3. В состав входят реактивы для экстракции НК.

Таблица 3. Комплектация набора «Грипп-А/H1pdm09+B+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», Standard +

Наименование	Расшифровка	Объем, мл	Описание	Количество
Комплект Base kit 1				
ПЦР-Смесь Грипп ABSH1	Смесь для проведения ОТ и ПЦР	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь розоватый или синеватый оттенок	1 пробирка
Разбавитель	Буфер для проведения ОТ и ПЦР	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ОКО	Отрицательный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ВКО1	Внутренний контрольный образец этапа выделения НК	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ОКВ	Отрицательный контрольный образец этапа выделения НК	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ПКО Грипп ABSH1	Положительный контроль образец	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
«Комплект НК-ex-ИМБИАН»				
1-L	Лизирующий раствор	70,0	Прозрачная бесцветная или желтоватая жидкость. Возможно выпадение осадка.	1 флакон
2-CU	Сорбент универсальный	3,0	Мелкодисперсная суспензия от белого до темно-бежевого цвета	1 флакон

¹ Эксплуатационная документация (инструкция по применению, паспорт качества, вкладыш в инструкцию) не входит в состав изделия, но входит в комплект поставки изделия. Набор реактивов для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами (при необходимости). Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

3-W1	Раствор для отмывки 1	30,0	Прозрачная бесцветная жидкость. Возможно выпадение осадка.	1 флакон
4-W2	Раствор для отмывки 2	100,0	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон
5-E	Буфер для элюции	10,0	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон
Паспорт качества ²				1 шт
Инструкция ²				1 шт
Вкладыш в инструкцию ²				1 шт

Комплектация варианта исполнения Standard + Auto представлена в таблице 4. В состав входят реактивы для автоматического выделения НК.

Таблица 4. Комплектация набора «Грипп-А/Н1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», Standard + Auto

Наименование	Расшифровка	Объем, мл	Описание	Количество
Комплект Base kit 1				
ПЦР-Смесь Грипп ABSH1	Смесь для проведения ОТ и ПЦР	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь розоватый или синеватый оттенок	1 пробирка
Разбавитель	Буфер для проведения ОТ и ПЦР	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ОКО	Отрицательный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ВКО1	Внутренний контрольный образец этапа выделения НК	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ОКВ	Отрицательный контрольный образец этапа выделения НК	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ПКО Грипп ABSH1	Положительный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
Комплект «НК-ex-AUTO-ИМБИАН»				
1-L-AUTO	Лизирующий раствор	70,0	Прозрачная бесцветная или слегка желтоватая жидкость. Допускается	1 флакон

² Эксплуатационная документация (инструкция по применению, паспорт качества, вкладыш в инструкцию) не входит в состав изделия, но входит в комплект поставки изделия. Набор реактивов для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами (при необходимости). Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

			образование осадка в виде кристаллов. Допускается наличие белых хлопьев в растворе.	
2-М	Сорбент универсальный магнетизированный	3,0	Суспензия черного или коричневого цвета	1 флакон
Протеиназа К	Протеиназа К (лиофилизированная)	1,0 (после восстановления)	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка
БП	Буфер для растворения протеиназы	1,0	Прозрачная бесцветная жидкость.	1 пробирка
3-W1-AUTO	Раствор для отмытки 1	30,0	Прозрачная бесцветная жидкость. Возможно выпадение осадка.	1 флакон
4-W2	Раствор для отмытки 2	100,0	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон
5-E	Буфер для элюции	10,0	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон
Паспорт качества ³				1 шт
Инструкция ³				1 шт
Вкладыш в инструкцию ³				1 шт

Комплектация варианта исполнения LF1 представлена в таблице 5. Реактивы для экстракции НК в состав не входит.

Таблица 5. Комплектация набора «Грипп-А/H1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», LF1

Наименование	Расшифровка	Объем, мл	Описание	Количество
Комплект Base kit 2				
ПЦР-Смесь Грипп ABSH1 LF1	стрипы с готовой лиофилизированной ПЦР-смесью	-	Лиофилизат, порошок, ПЦР-смесь	12 стрипов по 8 пробирок
ОКО	Отрицательный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ВКО1	Внутренний контрольный образец этапа выделения НК	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ОКВ	Отрицательный контрольный образец	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка

³ Эксплуатационная документация (инструкция по применению, паспорт качества, вкладыш в инструкцию) не входит в состав изделия, но входит в комплект поставки изделия. Набор реагентов для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами (при необходимости). Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

	этапа выделения НК			
ПКО Грипп ABSH1	Положительный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
Паспорт качества ⁴				1 шт
Инструкция ⁴				1 шт
Вкладыш в инструкцию ⁴				1 шт

Комплектация варианта исполнения LF1 + представлена в таблице 6. В комплект входят реактивы для экстракции НК.

Таблица 6. Комплектация набора «Грипп-А/H1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», LF1+

Наименование	Расшифровка	Объем, мл	Описание	Количество
Комплект Base kit 2				
ПЦР-Смесь Грипп ABSH1 LF1	стрипы с готовой лиофилизированной ПЦР-смесью	-	Лиофилизат, порошок, ПЦР-смесь	12 стрипов по 8 пробирок
ОКО	Отрицательный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ВКО1	Внутренний контрольный образец этапа выделения НК	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ОКВ	Отрицательный контрольный образец этапа выделения НК	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ПКО Грипп ABSH1	Положительный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
Комплект «НК-ex-ИМБИАН»				
1-L	Лизирующий раствор	70,0	Прозрачная бесцветная или желтоватая жидкость. Возможно выпадение осадка	1 флакон
2-CU	Сорбент универсальный	3,0	Мелкодисперсная суспензия от белого до темно-бежевого цвета	1 флакон
3-W1	Раствор для отмывки 1	30,0	Прозрачная бесцветная жидкость. Возможно	1 флакон

⁴ Эксплуатационная документация (инструкция по применению, паспорт качества, вкладыш в инструкцию) не входит в состав изделия, но входит в комплект поставки изделия. Набор реагентов для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами (при необходимости). Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

			выпадение осадка.	
4-W2	Раствор для отмывки 2	100,0	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон
5-E	Буфер для элюции	10,0	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон
Паспорт качества ⁵				1 шт
Инструкция ⁵				1 шт
Вкладыш в инструкцию ⁵				1 шт

Комплектация варианта исполнения LF1+ Auto представлена в таблице 7. В комплект входят реактивы для автоматической экстракции НК.

Таблица 7. Комплектация набора «Грипп-А/H1pdm09+B+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», LF1 + Auto

Наименование	Расшифровка	Объем, мл	Описание	Количество
Комплект Base kit 2				
ПЦР-Смесь ГРИПП ABSH1 LF1	стрипы с готовой лиофилизированной ПЦР-смесью	-	Лиофилизат, порошок, ПЦР-смесь.	12 стрипов по 8 пробирок
ОКО	Отрицательный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ВКО1	Внутренний контрольный образец этапа выделения НК	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ОКВ	Отрицательный контрольный образец этапа выделения НК	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ПКО Грипп ABSH1	Положительный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
Комплект «НК-ex-AUTO-ИМБИАН»				
1-L-AUTO	Лизирующий раствор	70,0	Прозрачная бесцветная или слегка желтоватая жидкость. Допускается образование осадка в виде кристаллов. Допускается наличие белых хлопьев в	1 флакон

⁵ Эксплуатационная документация (инструкция по применению, паспорт качества, вкладыш в инструкцию) не входит в состав изделия, но входит в комплект поставки изделия. Набор реактивов для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами (при необходимости). Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

			растворе	
2-М	Сорбент универсальный магнетизированный	3,0	Суспензия черного или коричневого цвета	1 флакон
Протеиназа К	Протеиназа К (лиофилизированная)	1,0 мл (после восстановления)	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка
БП	Буфер для растворения протеиназы	1,0	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
3-W1-AUTO	Раствор для отмывки 1	30,0	Прозрачная бесцветная жидкость. Возможно выпадение осадка.	1 флакон
4-W2	Раствор для отмывки 2	100,0	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон
5-E	Буфер для элюции	10,0	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон
Паспорт качества ⁶				1 шт
Инструкция ⁶				1 шт
Вкладыш в инструкцию ⁶				1 шт

Комплектация варианта исполнения LF2 представлена в таблице 8. В комплект не входят реактивы для экстракции НК.

Таблица 8. Комплектация набора «Грипп-А/H1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», LF2.

Наименование	Расшифровка	Объем, мл	Описание	Количество
Комплект Base kit 3				
ПЦР-Смесь Грипп ABSH1 LF2	пробирки с готовой лиофилизированной ПЦР-смесью	-	Лиофилизат, порошок, ПЦР-смесь	100 пробирок
ОКО	Отрицательный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ВКО1	Внутренний контрольный образец этапа выделения НК	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ОКВ	Отрицательный контрольный образец этапа выделения НК	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка

⁶ Эксплуатационная документация (инструкция по применению, паспорт качества, вкладыш в инструкцию) не входит в состав изделия, но входит в комплект поставки изделия. Набор реагентов для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами (при необходимости). Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

ПКО Грипп ABSH1	Положительный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
Паспорт качества ⁷				1 шт
Инструкция ⁷				1 шт
Вкладыш в инструкцию ⁷				1 шт

Комплектация варианта исполнения LF2 + представлена в таблице 9. В комплект входят реактивы для экстракции НК.

Таблица 9. Комплектация «Грипп-А/H1pdm09+B+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», LF2 +

Наименование	Расшифровка	Объем, мл	Описание	Количество
Комплект Base kit 3				
ПЦР-Смесь Грипп ABSH1 LF2	пробирки с готовой лиофилизированной ПЦР-смесью	-	Лиофилизат, порошок, ПЦР-смесь	100 пробирок
ОКО	Отрицательный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ВКО1	Внутренний контрольный образец этапа выделения НК	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ОКВ	Отрицательный контрольный образец этапа выделения НК	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ПКО Грипп ABSH1	Положительный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
Комплект «НК-ех-ИМБИАН»				
1-L	Лизирующий раствор	70,0	Прозрачная бесцветная или желтоватая жидкость. Возможно выпадение осадка.	1 флакон
2-CY	Сорбент универсальный	3,0	Мелкодисперсная суспензия от белого до темно-бежевого цвета	1 флакон
3-W1	Раствор для отмывки 1	30,0	Прозрачная бесцветная жидкость. Возможно выпадение осадка.	1 флакон
4-W2	Раствор для отмывки 2	100,0	Прозрачная бесцветная	1 флакон

⁷ Эксплуатационная документация (инструкция по применению, паспорт качества, вкладыш в инструкцию) не входит в состав изделия, но входит в комплект поставки изделия. Набор реагентов для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами (при необходимости). Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

			жидкость	
5-Е	Буфер для элюции	10,0	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон
Паспорт качества ⁸				1 шт
Инструкция ⁸				1 шт
Вкладыш в инструкцию ⁸				1 шт

Комплектация варианта исполнения LF2 + Auto представлена в таблице 10. В состав входят реактивы для автоматизированной экстракции НК.

Таблица 10. Комплектация набора «Грипп-А/Н1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», LF2+Auto.

Наименование	Расшифровка	Объем, мл	Описание	Количество
Комплект Base kit 3				
ПЦР-Смесь Грипп ABSH1 LF2	пробирки с готовой лиофилизированной ПЦР-смесью	-	Лиофилизат, порошок, ПЦР-смесь	100 пробирок
ОКО	Отрицательный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ВКО1	Внутренний контрольный образец этапа выделения НК	1,1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ОКВ	Отрицательный контрольный образец этапа выделения НК	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
ПКО Грипп ABSH1	Положительный контрольный образец этапа ОТ и ПЦР	0,2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка
Комплект «НК-ex-AUTO-ИМБИАН»				
1-L-AUTO	Лизирующий раствор	70,0	Прозрачная бесцветная или слегка желтоватая жидкость. Допускается образование осадка в виде кристаллов. Допускается наличие белых хлопьев в растворе	1 флакон
2-M	Сорбент универсальный магнетизированный	3,0	Суспензия черного или коричневого цвета	1 флакон
Протеиназа К	Протеиназа К	1,0 мл	Вязкая, прозрачная	1 пробирка

⁸ Эксплуатационная документация (инструкция по применению, паспорт качества, вкладыш в инструкцию) не входит в состав изделия, но входит в комплект поставки изделия. Набор реагентов для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладозементами (при необходимости). Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

	(лиофилизированная)	(после восстановл ения)	бесцветная жидкость.	
БП	Буфер для растворения протеиназы	1,0	Прозрачная бесцветная жидкость.	1 пробирка
3-W1-AUTO	Раствор для отмывки 1	30,0	Прозрачная бесцветная жидкость. Возможно выпадение осадка.	1 флакон
4-W2	Раствор для отмывки 2	100,0	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон
5-E	Буфер для элюции	10,0	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон
Паспорт качества ⁹				1 шт
Инструкция ⁹				1 шт
Вкладыш в инструкцию ⁹				1 шт

Принцип действия

В основе принципа действия набора «Грипп-А/Н1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР» лежат реакции ОТ (обратной транскрипции РНК) и ПЦР (полимеразной цепной реакции). С помощью реакции ОТ происходит наработка кДНК, которая затем вступает в ПЦР. В результате происходит многократное удвоение каждого из искомым участков НК, включая ВКО1 (Внутренний контрольный образец 1). Накопление специфического продукта амплификации регистрируется путём измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме реального времени. Обе реакции осуществляются в одной пробирке, что позволяет уменьшить время проведения исследования, снизить вероятность контаминации и повысить чувствительность метода.

Методика исследования включает следующие этапы:

- пробоподготовка;
- экстракция НК;
- проведение реакций ОТ и ПЦР РВ.

Некоторые варианты исполнения предназначен для осуществления этапов экстракции НК и проведения реакций ОТ и ПЦР РВ. Некоторые варианты исполнения (см. п. 3.2) предназначены только для проведения реакций ОТ и ПЦР РВ.

Области амплификации указаны в таблице 11.

Таблица 11. Амплифицируемые фрагменты генома

Аналит	Область амплификации	Канал, соответствующий флуорофору
Грипп А (Influenza A virus)	7 сегмент (matrix gene)	ROX ¹⁰

⁹ Эксплуатационная документация (инструкция по применению, паспорт качества, вкладыш в инструкцию) не входит в состав изделия, но входит в комплект поставки изделия. Набор реагентов для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами (при необходимости). Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

¹⁰ При необходимости, детекция сигнала для флуорофора ROX осуществляется по каналу детекции для аналогичного флуорофора Texas Red

Пандемический субтип H1pdm09 гриппа А	Гемагглютинин ((HA) gene)	Cy5
Грипп В (Influenza B virus)	7 сегмент (matrix gene)	Cy5.5. ¹¹
Коронавирус (SARS-CoV-2)	S gene	FAM
ВКО1	Искусственно синтезированная последовательность плазида, соответствующая фрагменту генома бактериофага MS2	HEX. ¹²

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность (порог обнаружения)

Порог обнаружения набора «Грипп-А/H1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР» представлен в таблице 12.

Таблица 12. Аналитическая чувствительность (порог обнаружения)

Мишень	Аналитическая чувствительность (порог обнаружения), копий ГЭ/мл
Грипп А (Influenza virus A)	до 1×10^3
Грипп В (Influenza virus B)	до 1×10^3
Пандемический субтип H1pdm09 гриппа А	до 1×10^3
Коронавирус (SARS-CoV-2)	до 1×10^3

Аналитическая специфичность

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора «Грипп-А/H1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР» в отношении НК других вирусных и бактериальных инфекций: Bordetella parapertussis, Mycoplasma pneumoniae, Bordetella pertussis, Betacoronavirus 1 OC43, Bordetella bronchiseptica, Quantitative Synthetic Human coronavirus NL63 RNA, Haemophilus influenza Respiratory syncytial virus, Klebsiella pneumoniae Human rhinovirus, Staphylococcus aureus, Human parainfluenza virus, Streptococcus pneumoniae Human adenovirus, Legionella pneumophila Human metapneumovirus, Pseudomonas aeruginosa. Вирусы и бактерии исследовались в концентрациях не ниже 1×10^7 копий/мл.

Дополнительно подтверждалось отсутствие перекрестных реакций между выявляемыми вирусами при тестировании РНК вирусов в концентрации не менее 1×10^7 копий/мл.

Аналитическая специфичность набора реагентов дополнительно проверялась in silico со следующими инфекционными агентами: SARS-CoV, MERS-CoV.

Помимо этого, показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении геномной НК человека и домашних и сельскохозяйственных животных (кошки, собаки, овцы, коровы, свиньи).

Чувствительность

Определяется по «КП-Грипп-А/В+SARS-CoV-2» как процентное содержание образцов, определенных медицинским изделием как положительные – 100 %.

Специфичность

¹¹ При необходимости, детекция сигнала для флуорофора Cy5.5 осуществляется по каналу детекции для аналогичного флуорофора ABY.

¹² При необходимости, детекция сигнала для флуорофора HEX осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров JOE, Yellow и VIC

Определяется по «КП-Грипп-А/В+SARS-CoV-2» как процентное содержание образцов, определенных медицинским изделием как отрицательные – 100 %.

Воспроизводимость.

Определяется как процентное отношение суммы образцов «КП-Грипп-А/В+SARS-CoV-2», измеренных как положительные и отрицательные к общей сумме истинно положительных и истинно отрицательных образцов и составляет не менее 100 %.

Интерферирующие вещества

Допустимые концентрации интерферирующих веществ, при которых не снижается эффективность набора «Грипп-А/Н1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», указаны в таблице 13.

Таблица 13. Допустимые концентрации интерферентов

Интерферент	Интерферент	Допустимая концентрация вещества в образце	Обоснование исследованной концентрации
эндогенные	Муцин	5%	от объема
	Цельная Кровь	5%	от объема
экзогенные	Изопропиловый спирт	1%	10 % от рекомендованной дозы
	Метилацетат	1%	
	Раствор хлоргексидин биглюконат	2%	
	Мирамистин	0,001%	
	Пищевые продукты	50%	

Для снижения количества интерферирующих веществ, ингибирующих ПЦР, необходимо соблюдать правила взятия биологического материала.

Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Диагностическая специфичность и чувствительность набора «Грипп-А/Н1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР» представлены в таблице 14.

Таблица 14. Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность образцов

Тип образцов	Вирус	Диагностическая чувствительность ДИ 97,0 – 100 %, ДВ 95%	Диагностическая специфичность ДИ 99,3 – 100 %, ДВ 95%
Мазки из носоглотки и ротоглотки, эндотрахеальный аспират из трахеи, БАЛ	Influenza virus A	100 %	100 %
	Influenza virus B	100 %	100 %
	Influenza virus A H1pdm09	100 %	100 %
	SARS-CoV-2	100 %	100 %
Мокрота	Influenza virus A	100 %	100 %
	Influenza virus B	100 %	100 %
	Influenza virus A H1pdm09	100 %	100 %
	SARS-CoV-2	100 %	100 %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Требования к безопасности при работе с набором

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ № 4н от 6 июня 2012 г.).

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением требований СанПиН 2.1.3684-21 и СанПиН 3.3686-21.

При работе с набором следует использовать средства индивидуальной защиты (СИЗ) в соответствии с СП 2.1.3678-20, руководствоваться внутренними правилами по использованию СИЗ медицинского учреждения.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов клинического материала.

Поверхности рабочих столов, а также рабочих помещений следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.

Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

Набор должен применяться согласно Инструкции по применению, утвержденной в установленном порядке.

Указание на необходимость специальных мер предосторожности при утилизации или уничтожении

Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

Уничтожение изделий осуществляется организациями, имеющими соответствующую лицензию, на специально оборудованных площадках, полигонах и в помещениях в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральными законами, и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

Персонал, осуществляющий уничтожение изделий, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 287-113. Утилизация проводится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации медицинских отходов.

Утилизации должна подлежать вся упаковка, в том числе и транспортная. Персонал, осуществляющий уничтожение изделий, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

Экологические и физические риски

При соблюдении методов утилизации экологические и физические риски отсутствуют.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Зона выделения НК

– настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01-«Ламинар-с», производитель «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А);

- реагенты для приготовления мокроты и эндотрахеального аспирата («Муколизин» или 95% этиловый спирт);
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру +65 °С (например, «Термит», ДНК-Технология, Россия);
- набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, Biohit, Sartorius, Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером и без аэрозольного барьера (для работы с вакуумным отсасывателем, если он используется).
- вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия). Допускается работа без вакуумного отсасывателя.
- штативы для микропробирок на 1,5-2,0 мл / магнитный штатив;
- одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5-2,0 мл / Планшеты 96-луночные для станций выделения KingFisher Flex/Duo и гребенка наконечников KingFisher 96 для магнитов DW.
- центрифуга-вортекс не менее 2000 об/мин (например, ЦВ-2500, НПФ Хеликон, Россия);
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- адгезивная фольга или пленка парафильм;
- СИЗ в соответствии с МУ 1.3.2569-09;
- ёмкость с дезинфицирующим средством;
- холодильник от + 2 °С до + 8 °С с морозильной камерой от - 24 °С до - 18 °С.

При использовании вариантов исполнения Standard+Auto, LF1+Auto, LF2+Auto, дополнительно (Standard, LF1, LF2 при использовании комплекта «НК-ex-AUTO-ИМБИАН»):

- система для автоматического выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологического материала Auto-Pure 96 для диагностики in vitro, ООО "Ханчжоуская компания инструментов Аопэн", Китай (РЗН 2022/16430 от 26.01.2022) или Процессор магнитных частиц для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков "KingFisher" в следующих исполнениях: 1. KingFisher. 2. KingFisher ml. 3. KingFisher Flex. 4. KingFisher 96, "Термо Фишер Сайентифик Ой", Финляндия, ФСЗ 2009/05562 от 24.11.2009 г. или магнитный штатив (Например: Магнитный штатив МагниРэк-24х2 РЗН 2022/16360 от 21.01.2022 г.);

При использовании вариантов исполнения Standard+, LF1+, LF2+ (Standard, LF1, LF2 при использовании комплекта «НК-ex-ИМБИАН»), дополнительно:

- центрифуга для пробирок объемом 1,5 мл, с RCF не ниже 16 000 x g. (например, MiniSpin Eppendorf).

Зона проведения ОТ и ПЦР

- ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР -«Ламинар-С», Ламинарные системы, Россия);
- центрифуга-вортекс не менее 2000 об/мин (например, ЦВ-2500, НПФ Хеликон, Россия);
- набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия);
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером (например, «Наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных систем РУ ФСЗ 2012/12077);

- штативы для микропробирок на 0,2 и 1,5-2,0 мл.
- емкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;

- СИЗ в соответствии с МУ 1.3.2569-09;
- ёмкость с дезинфицирующим средством;
- холодильник от + 2 °С до + 8 °С с морозильной камерой от - 24 °С до - 18 °С.

При использовании вариантов исполнения Standard, Standard+, Standard+Auto и LF2, LF2+, LF2+Auto:

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками, или планшеты – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа (варианты исполнения Standard, Standard+ и Standard+Auto);
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора роторного типа (варианты исполнения Standard, Standard+ и Standard+Auto);
- плотно закрывающиеся пробирки объемом не менее 0,5 мл – для приготовления реакционной смеси (варианты исполнения Standard, Standard+ и Standard+Auto);
- программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного и планшетного типа например:
 - «Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q, с принадлежностями» (РУ № ФСЗ 2010/07595);
 - «Амплификатор детектирующий ДТ-96 по ТУ 9443-002-96301278-2007», ФСР 2007/01250;
 - «Амплификатор детектирующий "ДТпрайм" по ТУ 9443-004-96301278-2010», ФСР 2011/10229;
 - «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями» (CFX96), ФСЗ 2008/03399;
 - Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени», РЗН 2019/8446.

При использовании вариантов исполнения LF1, LF1+, LF1+Auto:

- программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» планшетного типа, например:
 - «Амплификатор детектирующий ДТ-96 по ТУ 9443-002-96301278-2007», ФСР 2007/01250;
 - «Амплификатор детектирующий "ДТпрайм" по ТУ 9443-004-96301278-2010», ФСР 2011/10229;
 - «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями» (CFX96), ФСЗ 2008/03399;
 - Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени», РЗН 2019/8446.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Материал для исследования

Материалом для исследования служат мазки из носоглотки и ротоглотки, мокрота, эндотрахеальный аспират из трахеи, БАЛ (бронхоальвеолярный лаваж).

Забор диагностического материала осуществляется в соответствии с методическими рекомендациями МР 3.1.2.0304-22.

Упаковка, маркировка и транспортировка исследуемого материала осуществляются в соответствии с требованиями и правилами к работе с материалами, согласно СанПиН 3.3686-21.

Пробоподготовка

Мазки из носоглотки и ротоглотки можно исследовать без дополнительной пробоподготовки.

БАЛ перемешать на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием. 1 мл материала перенести в пробирку объемом 1,5 - 2,0 мл. Центрифугировать 10 минут при 7000-10000 g (например, 10 - 12 000 об/мин для лабораторной центрифуги MiniSpin Eppendorf). Удалить супернатант, оставляя над осадком 100-200 мкл надосадочной жидкости. Тщательно перемешать оставшееся содержимое на вортексе. Полученный образец использовать для экстракции НК.

Для эндотрахеального аспирата и мокроты необходимо провести разжижение. Разжижение мокроты можно проводить с помощью раствора «Муколизин» или 95% этилового спирта. Для этого в емкость с мокротой добавляют «Муколизин» в соотношении 5:1 («Муколизин»: мокрота), либо равный объем 95% этилового спирта. Полученную смесь выдерживают при комнатной температуре 20-30 минут (в случае обработки Муколизин) и 10 минут (в случае обработки 95% этиловым спиртом). Смесь необходимо периодически перемешивать. 100 мкл полученной взвеси использовать для выделения нуклеиновых кислот. Не захватывать комки слизи!

Условия хранения и перевозки биологического материала:

- при температуре от +20 °C до +25 °C – в течение 6 часов;
- при температуре от +2 °C до +8 °C – в течение 3 суток;
- при температуре от -24 °C до -16 °C – в течение 1 недели;
- при температуре не выше -68 °C – длительно.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выделение НК

Выделение НК осуществляется комплектами «НК-ex-ИМБИАН» (входит в варианты исполнения Standard+, LF1+ и LF2+) и «НК-ex-AUTO-ИМБИАН» (входит в варианты исполнения Standard+Auto, LF1+Auto и LF2+Auto). В вариантах исполнения Standard, LF1 и LF2 набор для экстракции НК не предусмотрен. В таком случае выделение НК следует осуществлять на выбор наборами «НК-ex-ИМБИАН» или «НК-ex-AUTO-ИМБИАН» или например: «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов (РеалБест Сорбитус) по ТУ 21.20.23-109-23548172-2020», РЗН 2020/11364. При работе с этими вариантами исполнения НК следует выделять согласно протоколу инструкции производителя.

Предварительная подготовка

– При наличии в растворах 1-L и/или 3-W1 и/или 1-L-AUTO и/или 3-W1-AUTO осадка, необходимо прогреть растворы при температуре + 60 °C до полного растворения осадка.

При использовании комплекта «НК-ex-ИМБИАН»:

– Тщательно ресуспендировать 2-CY, содержащий сорбент универсальный, на вортексе (при работе с вариантами исполнения Standard+, LF1+, LF2+).

При использовании комплекта «НК-ex-AUTO-ИМБИАН»:

– Перед началом работы перелить раствор БП в пробирку с лиофилизированной 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 морозилке при - 20° С (при работе с вариантами исполнения Standard+Auto, LF1+Auto, LF2+Auto).

– Тщательно ресуспендировать раствор 2-М, содержащий магнетизированный сорбент, на вортексе для комплекта «НК-ех-AUTO-ИМБИАН» (при работе с вариантами исполнения Standard+Auto, LF1+Auto, LF2+Auto).

– На этапе выделения НК для внесения и добавления реагентов использовать наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.

Экстракция НК в зависимости от варианта исполнения

Выделение НК комплектом «НК-ех-ИМБИАН» (при работе с вариантами исполнения Standard+, LF1+, LF2+ (Standard, LF1, LF2 при необходимости)).

1. Отобрать и, при необходимости, промаркировать нужное количество одноразовых пробирок 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 °С в термостате.

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 °С 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. Перемешать на вортексе в течение в течение 2-5 секунд.

15. Поместить в термостат при температуре + 60 °С 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. Пробы готовы к переносу в пробирки не содержащие ДНК-аз и РНК-аз и постановке реакции ОТ и ПЦР.

Очищенная НК может храниться до 24 ч при температуре от +2 °С до +8 °С и до года при температуре не выше -16 °С.

Выделение НК комплектом «НК-ex-AUTO-ИМБИАН» (при работе с вариантами исполнения Standard+Auto, LF1+Auto, LF2+Auto (Standard, LF1, LF2 при необходимости))

1. Отобрать 5 глубоколоночных планшетов (либо 4 глубоколоночных планшета и 1 стандартный) и 1 глубоколоночный или стандартный планшет с гребенкой. Внести лунки (количество лунок соответствует количеству исследуемых образцов) каждого планшета растворы в соответствии с таблицей 15.

Таблица 15. Подготовка планшет

Рабочий раствор	Подпись планшета	Тип планшета	Объем на лунку	Наименование 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
4.1- W2	W2	С глубокими лунками	500,0 мкл	Wash Plate 2
4.2-W2	W2	С глубокими лунками	500.0 мкл	Wash Plate 3
Рабочий раствор ¹³	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. Подготовка рабочего раствора для внесения в планшет L:

– Пробирки с Протеиназой К, ВКО1, и ОКВ осадите 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 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).

¹³ Рабочий раствор следует приготовить руководствуясь описанием ниже

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

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

4. Установите планшеты в специально отведенное место в соответствии с протоколом. Протокол экстракции НК выберите в соответствии с таблицей 16.

Таблица 16. Перечень протоколов для экстракции НК

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

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 нажимайте 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 ДНК-аз и РНК-аз и постановке реакции ОТ и ПЦР.

6. При необходимости перенести надосадочную жидкость не захватывая сорбент (не более 90,0 мкл) в промаркированные пробирки от 1 до 10 соответственно не содержащие ДНК-аз и РНК-аз объемом не менее 0,2 мл.

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

Выделение НК с использованием магнитного штатива комплектом «НК-ex-AUTO-ИМБИАН» (при работе с вариантами исполнения Standard+Auto, LF1+Auto, LF2+Auto (Standard, LF1, LF2 при необходимости))

1. Отобрать и, при необходимости, промаркировать нужное количество одноразовых пробирок 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 лунки планшета L по 750,0 мкл полученной смеси.

- в случае использования набора не целиком, необходимо подготовить нужное количество 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 раствора.

4. В каждую пробирку с раствором для лизиса (1-L-AUTO раствор) и ВКО1 внести по 100,0 мкл подготовленных проб. В пробирку отрицательного контроля выделения (ОКВ) внести 100,0 мкл ОКВ.

5. Поместить пробирки в магнитный штатив. Подождать, пока магнитные частицы полностью перейдут в осадок. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками

6. Добавить 300,0 мкл раствора 2-W1-AUTO, тщательно перемешать на вортексе в течение 2-5 секунд или пипетированием в течение 2-5 секунд.

7. Поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

8. Добавить 500,0 мкл раствора 3-W2, тщательно перемешать на вортексе и в течение 2-5 секунд ли пипетированием в течение 2-5 секунд.

9. Поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц удалить супернатант.

10. Добавить 500,0 мкл раствора 3-W2, тщательно перемешать на вортексе и в течение 2-5 секунд ли пипетированием в течение 2-5 секунд.

11. Поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц удалить супернатант.

12. Добавить 100,0 мкл раствора 5-E, тщательно перемешать на вортексе и в течение 2-5 секунд ли пипетированием в течение 2-5 секунд.

13. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре (от + 15 °C до + 25 °C).

14. Поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц супернатант содержит выделенную геномную НК.

Надосадочная жидкость содержит очищенные НК. Пробы готовы к переносу в пробирки не содержащие ДНК-аз и РНК-аз и постановке реакции ОТ и ПЦР.

15. Перенести надосадочную жидкость (не более 90,0 мкл) в новую чистую пробирку не содержащую ДНК-аз и РНК-аз для постановки реакции ОТ и ПЦР. Пробы готовы к постановке реакции ОТ и ПЦР.

Этапы проведения амплификации

Подготовка этапа амплификации

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 °C (с использованием термостата).

2. Пробирку с разбавителем нельзя греть в термостате! Разбавитель необходимо размораживать при температуре от +15 °C до +25 °C до полной разморозки.

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

Внимание! При использовании для работы амплификаторов с считыванием через крышку (например, ДТ-96), запрещается наносить маркировку на крышку пробирок!

В зависимости от варианта исполнения медицинского изделия использовать один из предложенных амплификаторов в соответствии с таблицей 17.

Таблица 17. – Амплификаторы для анализа

Вариант исполнения	Амплификатор для анализа
Standard	Rotor-Gene 6000/Q, ДТ-96, ДТпрайм, CFX96, Quant Studio 5

Standard+ Standard+Auto	
LF1 LF1+ LF1+Auto	ДТ-96, ДТпрайм, CFX96, Quant Studio 5
LF2 LF2+ LF2+Auto	Rotor-Gene 6000/Q, ДТ-96, ДТпрайм, CFX96, Quant Studio 5

Подготовка реакционной смеси для вариантов исполнения Standard, Standard+, Standard+Auto

Общий объем реакционной смеси – 30,0 мкл, объем НК-пробы – 10,0 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок не менее 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 ABSH1.

Примечание: при работе с амплификаторами планшетного типа сбросить капли со стенок пробирок с помощью вортекса.

Подготовка реакционной смеси для вариантов исполнения LF1, LF1+, LF1+Auto

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.

2. 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 ABSH1.

Примечание: при работе с амплификаторами планшетного типа сбросить капли со стенок пробирок с помощью вортекса.

Подготовка реакционной смеси для вариантов исполнения LF2, LF2+, LF2+Auto

1. Отобрать необходимое количество пробирок с лиофилизированной готовой реакционной смесью, входящих в комплект вариантов LF2, LF2+, LF2+Auto.

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.

Примечание: при работе с амплификаторами планшетного типа сбросить капли со стенок пробирок с помощью вортекса.

3. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

Внимание! Не рекомендуется наносить на оптическую пленку какие-либо надписи. Вы можете зафиксировать наименования проб на матрице образцов.

Примечание: поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200-1800 об/мин в течение 1 минуты.

Проведение ОТ и ПЦР

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.

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 18.

Таблица 18. Температурно-временной режим амплификации

п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	50 °C – 15 мин	1
2	95 °C – 3 мин	1
3	95 °C – 10 сек	5
	56 °C – 10 сек	
	72 °C – 10 сек	
4	95 °C – 10 сек	40
	56 °C – 15 сек, детекция FAM, HEX ¹⁴ , ROX ¹⁵ , Cy5, Cy5.5 ¹⁶	
	72 °C – 15 сек	

После завершения программы амплификации отработанные пробирки утилизируют в соответствии с СанПиНом 2.1.3684-21.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первичная обработка данных

Перед началом анализа полученных результатов необходимо провести первичную обработку полученных данных. для этого необходимо применить настройки, указанные в таблице 19.

¹⁴ Детекция сигнала для флуорофора HEX осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров R6G, JOE, Yellow и VIC.

¹⁵ При необходимости, детекция сигнала для флуорофора ROX осуществляется по каналу детекции для аналогичного флуорофора Texas Red.

¹⁶ При необходимости, детекция сигнала для флуорофора Cy5.5 осуществляется по каналу детекции для аналогичного флуорофора ABY.

Таблица 19. Первичная обработка полученных данных

Амплификатор	Настройки для обработки данных
Rotor-Gene 6000/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+
Quant Studio 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 14-15. 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

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 «Сb» для исследуемого образца).

Оценка валидности результатов и анализ результатов исследования

Перед началом анализа следует оценить прохождение контролей в ОКВ, ОКО и ПКО в соответствии с таблицей 20.

Сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента, регистрируется по каналу для флуорофора HEX.

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 20. 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 не валидный. Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка!
ОКО	Нет значений, либо значения >30					Норма. ОТ и ПЦР прошла успешно
	Значение ≤ 30 по одному или нескольким каналам					Результат не валидный. Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка!
ПКО	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 анализа отрицательный

Появление значения Ct ниже 30 в таблице результатов для отрицательного контроля ОКО и для отрицательного контроля экстракции ОКВ на любом из каналов FAM, ROX, Cy5 и Cy5.5 свидетельствует о наличии специфической контаминации реактивов или образцов в зонах проведения ПЦР и выделения соответственно. В этом случае результаты анализа для инфекции, по которой была выявлена контаминация считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб для этой инфекции, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации. В случае успешного прохождения контролей оценить результаты анализа в соответствии с таблицей 21.

Таблица 21. Анализ результатов исследования

№	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 не выше 28 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 не выше 28 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 не выше 28 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 не выше 28 либо отсутствует.	НК Influenza virus B обнаружена

УТИЛИЗАЦИЯ

Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

Уничтожение изделий осуществляется организациями, имеющими соответствующую лицензию, на специально оборудованных площадках, полигонах и в помещениях в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральными законами, и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

Персонал, осуществляющий уничтожение изделий, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию набора реагентов следует проводить в соответствии с СанПиНом 2.1.3684-21, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности

Срок годности набора реагентов «Грипп-А/Н1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР» составляет 18 месяцев от даты изготовления при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. После вскрытия набор реагентов годен в течение срока годности при условии соблюдения условий хранения. Изделие с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Хранение

Варианты исполнения Standard+, Standard+Auto, LF1+, LF1+Auto, LF2+, LF2+Auto следует разукomплектовать и хранить при условиях, указанных ниже.

1. Компонент «Base kit 1», входящий в варианты исполнения: Standard, Standard+, Standard+Auto следует хранить в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от -20 °C до -18 °C в течение всего срока годности набора.

2. Компонент «Base kit 2», входящий в варианты исполнения: LF1, LF1+, LF1+Auto и компонент «Base kit 3», входящий в варианты исполнения: LF2, LF2+, LF2+Auto следует хранить при температуре от +2 °C до +8 °C в течение всего срока годности набора в упаковке предприятия-изготовителя..

3. Компонент «Комплект НК-ex-ИМБИАН», входящий в варианты исполнения: Standard+, LF1+, LF2+ следует хранить при температуре от +2 °C до +30 °C в течение всего срока годности набора в упаковке предприятия-изготовителя.

4. Компонент «Комплект НК-ex-AUTO-ИМБИАН», входящий в варианты исполнения: Standard+ Auto, LF1+ Auto, LF2+Auto следует хранить при температуре от +2 °C до +30 °C в течение всего срока годности набора в упаковке предприятия-изготовителя.

5. Раствор протеиназы К после приготовления хранить при температуре -20 °C в течение всего срока годности.

6. После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты компонента «Base kit 1» хранятся при температуре от -20 °C до -18 °C в течение всего срока годности набора.

7. После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты компонента «Base kit 2», «Base kit 3» хранятся в течении всего срока годности при температуре от +2 °С до +8 °С.

8. После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты компонента «Комплект НК-ех-ИМБИАН», «Комплект НК-ех-AUTO-ИМБИАН» хранятся в течении всего срока при температуре от +2 °С до +30 °С.

9. Изделия, хранившиеся с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Транспортирование

Набор «Грипп-А/Н1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», транспортировать всеми видами крытых транспортных средств соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Изделие допускается транспортировать в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры. Транспортировать набор следует при температуре от +2 °С до +8 °С до 20 суток. Допускается транспортирование при температуре внутри термоконтейнера от +2 °С до +25 °С не более 5 суток.

Атмосферное давление не контролируется, так как не влияет на качество изделия.

Набор реагентов при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения. Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Производитель гарантирует соответствие набора реагентов «Грипп-А/Н1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», требованиям настоящей инструкции по применению при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных инструкцией по применению.

Рекламации на специфические и физические свойства набора реагентов «Грипп-А/Н1pdm09+В+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР» направлять по адресу производителя: Общество с ограниченной ответственностью «ИМБИАН ЛАБ» (ООО «ИМБИАН ЛАБ»), 630559, Россия, Новосибирская область, г.о. рабочий поселок Кольцово, р.п. Кольцово, ул. Садовая, д. 2/7, этаж 2, помещ. 2, тел.: +7 (383) 209-34-54, info@imbian.ru, www.imbian.ru.

РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ МАРКИРОВКИ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ И ЕГО УПАКОВКИ

Символ	Наименование символа	Символ	Наименование символа
	Использовать до		Запрет на повторное применение
	Дата изготовления		Изготовитель
	Код партии		Не допускать воздействия солнечного света
	Номер по каталогу		Содержимого достаточно для проведения <n> тестов
	Обратитесь к инструкции по применению или инструкции по применению в электронном виде		Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Температурный диапазон		Бережное обращение
	H302: вредно при проглатывании H315: при попадании на кожу вызывает раздражение H319: при попадании в глаза вызывает выраженное раздражение		

ШТРИХКОД

Вариант исполнения	Штрихкод
Комплект «Грипп-А/H1pdm09+B+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», Standard	4620102808012
Комплект «Грипп-А/H1pdm09+B+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», Standard+	4620102808036
Комплект «Грипп-А/H1pdm09+B+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», Standard+ Auto	4620102808050
Комплект «Грипп-Скрин+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», LF1	4620102808098
Комплект «Грипп-Скрин+SARS-CoV-2- ИМБИАН-ПЦР», LF1+	4620102808104
Комплект «Грипп-Скрин+SARS-CoV-2- ИМБИАН-ПЦР», LF1+ Auto	4620102808111
Комплект «Грипп-Скрин+SARS-CoV-2-ИМБИАН-ПЦР», LF2	4620102808128
Комплект «Грипп-Скрин+SARS-CoV-2- ИМБИАН-ПЦР», LF2+	4620102808135
Комплект «Грипп-Скрин+SARS-CoV-2- ИМБИАН-ПЦР», LF2+ Auto	4620102808142

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики *in vitro* для профессионального применения

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*.

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.

Варианты исполнения:

I. Standard:

Base kit 1:

- ПЦР-Смесь Грипп ABSH1, 1,1 мл – 1 пр.
- Разбавитель, 1,1 мл – 1 пр.
- ОКО, 0,2 мл – 1 пр.
- ВКО1, 1,1 мл – 1 пр.
- ОКВ, 0,2 мл – 1 пр.
- ПКО Грипп ABSH1, 0,2 мл – 1 пр.

II. Standard+:

Base kit 1:

- ПЦР-Смесь Грипп ABSH1, 1,1 мл – 1 пр.
- Разбавитель, 1,1 мл – 1 пр.
- ОКО, 0,2 мл – 1 пр.
- ВКО1, 1,1 мл – 1 пр.
- ОКВ, 0,2 мл – 1 пр.
- ПКО Грипп ABSH1, 0,2 мл – 1 пр.

Комплект НК-ех-ИМБИАН:

- 1-L, 70,0 мл – 1 фл.
- 2-CY, 3,0 мл – 1 фл.
- 3-W1, 30,0 мл – 1 фл.
- 4-W2, 100,0 мл – 1 фл.
- 5-E, 10,0 мл – 1 фл.

III. Standard+Auto:

Base kit 1:

- ПЦР-Смесь Грипп ABSH1, 1,1 мл – 1 пр.
- Разбавитель, 1,1 мл – 1 пр.
- ОКО, 0,2 мл – 1 пр.
- ВКО1, 1,1 мл – 1 пр.
- ОКВ, 0,2 мл – 1 пр.
- ПКО Грипп ABSH1, 0,2 мл – 1 пр.

Комплект НК-ех-AUTO-ИМБИАН:

- 1-L-AUTO, 70,0 мл – 1 фл.
- 2-M, 3,0 мл – 1 фл.
- Протеиназа К, 1,0 мл (после восстановления) – 1 пр.
- БП, 1,0 мл – 1 пр.
- 3-W1-AUTO, 30,0 мл – 1 фл.
- 4-W2, 100,0 мл – 1 фл.
- 5-E, 10,0 мл – 1 фл.

IV. LF1:

Base kit 2:

- ПЦР-Смесь Грипп ABSH1 LF1 – 12 стрипов по 8 пр.
- ОКО, 0,2 мл – 1 пр.
- ВКО1, 1,1 мл – 1 пр.
- ОКВ, 0,2 мл – 1 пр.
- ПКО Грипп ABSH1, 0,2 мл – 1 пр.

V. LF1+:

Base kit 2:

- ПЦР-Смесь Грипп ABSH1 LF1 – 12 стрипов по 8 пр.
- ОКО, 0,2 мл – 1 пр.
- ВКО1, 1,1 мл – 1 пр.
- ОКВ, 0,2 мл – 1 пр.
- ПКО Грипп ABSH1, 0,2 мл – 1 пр.

Комплект НК-ех-ИМБИАН:

- 1-L, 70,0 мл – 1 фл.
- 2-CY, 3,0 мл – 1 фл.
- 3-W1, 30,0 мл – 1 фл.
- 4-W2, 100,0 мл – 1 фл.
- 5-E, 10,0 мл – 1 фл.

VI. LF1+Auto:

Base kit 2:

- ПЦР-Смесь Грипп ABSH1 LF1 – 12 стрипов по 8 пр.
 - ОКО, 0,2 мл – 1 пр.
 - ВКО1, 1,1 мл – 1 пр.
 - ОКВ, 0,2 мл – 1 пр.
 - ПКО Грипп ABSH1, 0,2 мл – 1 пр.
- Комплект НК-ех-AUTO-ИМБИАН:
- 1-L-AUTO, 70,0 мл – 1 фл.
 - 2-M, 3,0 мл – 1 фл.
 - Протеиназа К, 1,0 мл (после восстановления) – 1 пр.
 - БП, 1,0 мл – 1 пр.
 - 3-W1-AUTO, 30,0 мл – 1 фл.
 - 4-W2, 100,0 мл – 1 фл.
 - 5-E, 10,0 мл – 1 фл.

VII. LF2:

Base kit 3:

- ПЦР-Смесь Грипп ABSH1 LF2 – 100 пр.
- ОКО, 0,2 мл – 1 пр.
- ВКО1, 1,1 мл – 1 пр.
- ОКВ, 0,2 мл – 1 пр.
- ПКО Грипп ABSH1, 0,2 мл – 1 пр.

VIII. LF2+:

Base kit 3:

- ПЦР-Смесь Грипп ABSH1 LF2 – 100 пр.
 - ОКО, 0,2 мл – 1 пр.
 - ВКО1, 1,1 мл – 1 пр.
 - ОКВ, 0,2 мл – 1 пр.
 - ПКО Грипп ABSH1, 0,2 мл – 1 пр.
- Комплект НК-ех-ИМБИАН:
- 1-L, 70,0 мл – 1 фл.
 - 2-CY, 3,0 мл – 1 фл.
 - 3-W1, 30,0 мл – 1 фл.
 - 4-W2, 100,0 мл – 1 фл.
 - 5-E, 10,0 мл – 1 фл.

IX. LF2+Auto:

Base kit 3:

- ПЦР-Смесь Грипп ABSH1 LF2 – 100 пр.
- ОКО, 0,2 мл – 1 пр.
- ВКО1, 1,1 мл – 1 пр.
- ОКВ, 0,2 мл – 1 пр.
- ПКО Грипп ABSH1, 0,2 мл – 1 пр.

Комплект НК-ех-AUTO-ИМБИАН:

- 1-L-AUTO, 70,0 мл – 1 фл.
- 2-M, 3,0 мл – 1 фл.
- Протеиназа К, 1,0 мл (после восстановления.) – 1 пр.
- БП, 1,0 мл. – 1 пр.
- 3-W1-AUTO, 30,0 мл. – 1 фл.
- 4-W2, 100,0 мл. – 1 фл.
- 5-E, 10,0 мл – 1 фл.

Комплект поставки:

1. 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.

2. Паспорт – 1 шт. (предоставляется в составе поставки на каждую серию изделия).
3. Инструкция по применению – 1 шт.
4. Вкладыш в инструкцию – 1 шт.

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

35 лист об

Генеральный директор ООО «ИМБИАН ЛАБ»

В.В. Осипова «28» 06 2024 г.



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

Назначение

Набор предназначен для качественного дифференциального выявления РНК вирусов гриппа А с дифференциацией пандемического субтипа H1pdm09 гриппа А, гриппа В и коронавируса SARS-CoV-2 (включая альфа, бета, гамма, дельта, омикрон, лямбда) в биологическом материале (мазки из носоглотки и ротоглотки, мокрота, эндотрахеальный аспират из трахеи, БАЛ (бронхоальвеолярный лаваж) методом совмещенной реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ и ПЦР) в режиме реального времени (РВ).

Предназначен для диагностики *in vitro* при профессиональном применении как вспомогательное средство для выявления и дифференциальной диагностики инфекций, вызываемых вирусами гриппа А (позволяет дифференцировать пандемический субтип H1pdm09), В и SARS-CoV-2, для всех групп населения.

Подробное описание этапов проведения анализа приведено в таблице №1 для вариантов исполнения медицинского изделия «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», в зависимости от поставляемого варианта исполнения.

Таблица 1. Описание этапов проведения анализа

№	Этапы проведения анализа в зависимости от варианта исполнения
1.	<i>Этапы экстракции НК</i>
1.1.	<u>Предварительная подготовка:</u> – при наличии в растворах 1-L и/или 3-W1 и/или 1-L-AUTO и/или 3-W1-AUTO осадка, необходимо прогреть растворы при температуре + 60 °С до полного растворения осадка. <u>При использовании комплекта «НК-ex-ИМБИАН»:</u> – тщательно ресуспендировать 2-CY, содержащий сорбент универсальный, на вортексе (при работе с вариантами исполнения Standard+, LF1+, LF2+). <u>При использовании комплекта «НК-ex-AUTO-ИМБИАН»:</u> – перед началом работы перелить раствор БП в пробирку с лиофилизированной 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 морозилке при - 20° С (при работе с вариантами исполнения Standard+Auto, LF1+Auto, LF2+Auto). – тщательно ресуспендировать раствор 2-M, содержащий магнетизированный сорбент, на вортексе для комплекта «НК-ex-AUTO-ИМБИАН» (при работе с вариантами исполнения Standard+Auto, LF1+Auto, LF2+Auto).

	На этапе выделения НК для внесения и добавления реагентов использовать наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.
2.	Экстракция НК в зависимости от варианта исполнения
2.1.	<u>Выделение НК комплектом «НК-ех-ИМБИАН» (при работе с вариантами исполнения Standard+, LF1+, LF2+ (Standard, LF1, LF2 при необходимости))</u> – отобрать и, при необходимости, промаркировать нужное количество одноразовых пробирок не менее 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками. Количество пробирок будет равно количеству проб + ОКВ. – внести в каждую пробирку по 10,0 мкл ВКО1. Добавить в каждую пробирку по 700,0 мкл раствора 1-L. – 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. – 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 °С в термостате. – 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). – 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. – 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. – осадить 2-СУ центрифугированием при 12000 об/мин в течение 1 минуты. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками. – добавить в пробирки по 500,0 мкл раствора для отмывки 4-W2. Перемешать на вортексе в течение 2-5 секунд до получения однородной суспензии. – осадить 2-СУ центрифугированием при 12000 об/мин в течение 1 минуты. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками. – поместить пробирки в термостат при температуре + 60 °С на 5-15 минут для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты). Убедиться, что содержимое пробирок полностью высохло. – добавить в каждую пробирку по 100,0 мкл раствора. Перемешать на вортексе в течение в течение 2-5 секунд.

- поместить в термостат при температуре + 60 °С на 5 минут, периодически (каждые 2 минуты) встряхивая на вортексе.
- центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 минуты на микроцентрифуге.

Надосадочная жидкость содержит очищенные НК. Пробы готовы к переносу в пробирки не содержащие ДНК-аз и РНК-аз и постановке реакции ОТ и ПЦР.

Очищенная НК может храниться до 24 ч при температуре от +2 °С до +8 °С и до года при температуре не выше -16 °С.

Выделение НК комплектом «НК-ех-AUTO-ИМБИАН» (при работе с вариантами исполнения Standard+Auto, LF1+Auto, LF2+Auto (Standard, LF1, LF2 при необходимости))

- отобрать 5 глубоколоночных планшетов (либо 4 глубоколоночных планшета и 1 стандартный) и 1 глубоколоночный или стандартный планшет с гребенкой. Внести лунки (количество лунок соответствует количеству исследуемых образцов) каждого планшета растворы в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 Подготовка планшетов

Рабочий раствор	Подпись планшета	Тип планшета	Объем на лунку	Наименование планшета в приборе
Гребенка наконечников	-	С глубокими лунками/Стандартный	Поместите гребенку наконечников в планшет	Tip Comb
5-E	E	С глубокими лунками/Стандартный	100 мкл	Elution
3-W1-AUTO	W1	С глубокими лунками	300 мкл	Wash Plate 1
4.1- W2	W2	С глубокими лунками	500 мкл	Wash Plate 2
4.2-W2	W2	С глубокими лунками	500 мкл	Wash Plate 3
Рабочий раствор. ¹	L	С глубокими лунками	750 мкл	Lysis

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

Подготовка рабочего раствора для внесения в планшет L:

- пробирки с Протеиназой К, ВКО1, и ОКВ осадите кратковременным центрифугированием.
- приготовить 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 магномикса из расчета на одну точку выделения:

¹ Рабочий раствор следует приготовить руководствуясь описанием ниже

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 раствора.

– в лунки этого планшета внесите по 100,0 мкл исследуемых проб (с пипетированием). В пробу для отрицательного контроля выделения (ОКВ) необходимо внести 100 мкл ОКВ.

– установите планшеты в специально отведенное место в соответствии с протоколом. Протокол экстракции НК выберите в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 Перечень протоколов для экстракции НК

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

Перед первым использованием протокол необходимо скачать с сайта www.imbian.ru или запросить через почту info@imbian.ru, и установить в соответствии с информацией, изложенной в инструкции на сайте или в письме соответственно. В случае проблем с установкой обратиться на почту info@imbian.ru. При необходимости после установки каждого планшета нажимайте кнопку start для подтверждения установки.

– 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 ДНК-аз и РНК-аз и постановке реакции ОТ и ПЦР.

– при необходимости перенести надосадочную жидкость не захватывая сорбент (не более 90,0 мкл) в промаркированные пробирки от 1 до 10 соответственно не содержащие ДНК-аз и РНК-аз объемом не менее 0,2 мл.

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

Выделение НК с использованием магнитного штатива комплектом «НК-ex-AUTO-ИМБИАН» (при работе с вариантами исполнения Standard+Auto, LF1+Auto, LF2+Auto (Standard, LF1, LF2 при необходимости))

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

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

– приготовить раствор магномикса:

○ в случае использования набора целиком, перелить содержимое пробирок с ВКО1, Протеиназой К и 2-М во флакон с раствором 1-L-AUTO. Закрывать 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 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 раствора.

– в каждую пробирку с раствором для лизиса (1-L-AUTO раствор) и ВКО1 внести по 100,0 мкл подготовленных проб. В пробирку отрицательного контроля выделения (ОКВ) внести 100,0 мкл ОКВ.

– поместить пробирки в магнитный штатив. Подождать, пока магнитные частицы полностью перейдут в осадок. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

– добавьте по 300 мкл раствора 2-W1-AUTO, тщательно перемешать на вортексе в течение 2-5 секунд или пипетированием в течение 2-5 секунд.

– поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

– добавьте по 500 мкл раствора 3-W2, тщательно перемешать на вортексе в течение 2-5 секунд или пипетированием в течение 2-5 секунд.

– поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц удалить супернатант.

– добавьте по 500 мкл раствора 3-W2, тщательно перемешать на вортексе в течение 2-5 секунд или пипетированием в течение 2-5 секунд.

– поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц удалить супернатант.

– добавьте по 100 мкл раствора 5-Е, тщательно перемешать на вортексе и в течение 2-5 секунд ли пипетированием в течение 2-5 секунд.

– инкубировать 5 минут при комнатной температуре (от +15 °С до +25 °С).

– поместить пробирки в магнитный штатив, после осаждения частиц супернатант содержит выделенную геномную НК.

Надосадочная жидкость содержит очищенные НК. Пробы готовы к переносу в пробирки не содержащие ДНК-аз и РНК-аз и постановке реакции ОТ и ПЦР.

– перенести надосадочную жидкость (не более 90 мкл) в новую чистую пробирку не содержащую ДНК-аз и РНК-аз для постановки реакции ОТ и ПЦР. Пробы готовы к постановке реакции ОТ и ПЦР.

3. Этапы проведения амплификации в зависимости от варианта исполнения

3.1. Подготовка этапа амплификации

– 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).

– пробирку с разбавителем нельзя греть в термостате! Разбавитель необходимо размораживать при температуре от +15 °С до +25 °С до полной разморозки.

При использовании прибора CFX, он должен быть прогрет перед запуском эксперимента. не менее 15 мин. Внимание! При использовании для работы амплификаторов

с считыванием через крышку (например, ДТ-96), запрещается наносить маркировку на крышку пробирок!

В зависимости от варианта исполнения медицинского изделия использовать один из предложенных амплификаторов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Амплификаторы для анализа.

Вариант исполнения	Амплификатор для анализа
Standard Standard+ Standard+Auto	Rotor-Gene 6000/Q, ДТ-96, ДТпрайм, CFX96, Quant Studio 5
LF1 LF1+ LF1+Auto	ДТ-96, ДТпрайм, CFX96, Quant Studio 5
LF2 LF2+ LF2+Auto	Rotor-Gene 6000/Q, ДТ-96, ДТпрайм, CFX96, Quant Studio 5

Подготовка реакционной смеси для вариантов исполнения Standard, Standard+, Standard+Auto.

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, объем НК-пробы – 10 мкл.

– отобрать необходимое количество пробирок не менее 0,2 мл, исходя из количества выделенных проб (включая ВКО1) плюс положительный и отрицательный контроли для проведения ОТ и ПЦР. Промаркировать пробирки.

– в отдельной одноразовой пробирке смешать компоненты набора из расчета на каждую реакцию:

ПЦР-СМЕСЬ Грипп ABSH1 – 10 мкл;

Разбавитель – 10 мкл.

– перемешать смесь на вортексе в течении 2-5 секунд и сбросить капли кратковременным центрифугированием (2-5 секунд). Постараться не допускать вспенивания реакционной смеси.

– в приготовленные пробирки для ОТ и ПЦР внести по 20 мкл реакционной смеси.

– после этого последовательно внести:

в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) – 10 мкл ОКО;

в ряд пробирок для исследуемых проб – в каждую внести по 10 мкл НК соответствующей пробы (включая пробу ОКВ);

в пробирку с положительным контролем ПЦР (К+) – 10 мкл ПКО ABSH1.

Примечание: при работе с амплификаторами планшетного типа сбросить капли со стенок пробирок с помощью вортекса.

Подготовка реакционной смеси для вариантов исполнения LF1, LF1+, LF1+Auto

– отобрать необходимое количество стрипов с лиофилизированной готовой реакционной смесью, исходя из количества выделенных проб (включая ВКО1) плюс положительный и отрицательный контроли для проведения ОТ и ПЦР. Промаркировать пробирки.

– После этого последовательно внести:

в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) – 10 мкл ОКО;

в ряд пробирок для исследуемых проб – в каждую внести по 10 мкл НК соответствующей пробы (включая пробу ВКО1);

в пробирку с положительным контролем ПЦР (К+) – 10 мкл ПКО ABSH1.

Примечание: при работе с амплификаторами планшетного типа сбросить капли со стенок пробирок с помощью вортекса.

Подготовка реакционной смеси для вариантов исполнения LF2, LF2+, LF2+Auto

– отобрать необходимое количество пробирок с лиофилизированной готовой реакционной смесью, входящих в комплект вариантов LF2, LF2+, LF2+Auto.

– после этого последовательно внести:

в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) – 30 мкл ОКО;

в ряд пробирок для исследуемых проб – в каждую внести по 30 мкл НК соответствующей пробы (включая пробу ВКО1);

в пробирку с положительным контролем ПЦР (К+) – 30 мкл ПКО ABSH1.

Примечание: при работе с амплификаторами планшетного типа сбросить капли со стенок пробирок с помощью вортекса.

– Заклеить пробирки оптической плёнкой.

Внимание! Не рекомендуется наносить на оптическую пленку какие-либо надписи. Вы можете зафиксировать наименования проб на матрице образцов.

Примечание: поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200-1800 об/мин в течение 1 минуты

Проведение ОТ и ПЦР.

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.

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 5.

Таблица 5. Температурно-временной режим амплификации

п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	50°C – 15 мин	1
2	95°C – 3 мин	1
3	95°C – 10 сек	5
	56°C – 10 сек	
	72°C – 10 сек	
4	95°C – 10 сек	40
	56°C – 15 сек, детекция FAM, HEX ² , ROX ³ , Cy5, Cy5.5 ⁴	

²Детекция сигнала для флуорофора HEX осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров R6G, JOE, Yellow и VIC.

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

⁴ При необходимости, детекция сигнала для флуорофора Cy5.5 осуществляется по каналу детекции для аналогичного флуорофора ABY

	72°C – 15 сек	
--	---------------	--

После завершения программы амплификации отработанные пробирки утилизируют в соответствии с СанПиНом 2.1.3684-21.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первичная обработка данных

Перед началом анализа полученных результатов необходимо провести первичную обработку полученных данных. для этого необходимо применить настройки, указанные в таблице 6.

Таблица 6. Первичная обработка полученных данных

Амплификатор	Настройки для обработки данных
Rotor-Gene 6000/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+
Quant Studio 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 1. 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

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 в соответствии с таблицей 7.

Сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента, регистрируется по каналу для флуорофора HEX.

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 7. 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 не валидный. Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка!
ОКО	Нет значений, либо значения >30					Норма. ОТ и ПЦР прошла успешно
	Значение ≤ 30 по одному или нескольким каналам					Результат не валидный. Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка!
ПКО	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 анализа отрицательный

Появление значения Ct ниже 30 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 8.

Таблица 8. 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 не выше 28 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 не выше 28 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 не выше 28 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 не выше 28 либо отсутствует.	НК Influenza virus B обнаружена

Пронумеровано, пронумеровано
и скреплено печатью

10 лист об
Генеральный директор ООО «ИМБИАН ЛАБ»

В.В. Осипова «28 06» 202 г.

