

Набор реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae*,  
*Chlamydophila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*  
методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»  
«АмплиПрайм® *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* / *S. pneumoniae* / *H. influenzae*»  
по ТУ 21.20.23-178-09286667-2022

**АмплиПрайм® *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* /  
*S. pneumoniae* / *H. influenzae***

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**



---

## ОГЛАВЛЕНИЕ

---

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ .....	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА .....	4
2.1. Формы выпуска, состав и комплектность .....	4
2.2. Принцип метода .....	6
2.3. Техническое обслуживание и ремонт .....	6
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА .....	7
3.1. Внутренний контроль качества.....	7
3.2. Рекомендуемые контрольные материалы.....	8
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	8
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ .....	9
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	10
6.1. Взятие исследуемого материала .....	10
6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала .....	10
6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов.....	11
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов .....	11
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ .....	13
7.1. Бронхо-альвеолярный лаваж .....	13
7.2. Мазки из полости носа.....	13
7.3. Мазки со слизистой оболочки ротоглотки.....	14
7.4. Мокрота.....	14
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	15
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала.....	15
8.2. Подготовка реагентов для амплификации .....	15
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции.....	16
8.4. Анализ и вычисление результатов.....	17
8.5. Интерпретация результатов.....	18
8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению.....	19
8.7. Диагностическое значение полученного результата .....	19
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА .....	20
9.1. Предел обнаружения .....	20
9.2. Аналитическая специфичность.....	20
9.3. Воспроизводимость и повторяемость измерения .....	21
9.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность.....	21
9.5. Оценка влияния интерферирующих веществ.....	23
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА .....	24
10.1. Срок годности.....	24
10.2. Транспортирование .....	24
10.3. Хранение.....	24
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	24
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ .....	25

---

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

---

Сt	– Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	– внутренний контрольный образец
ГЭ	– геномные эквиваленты
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
ПКО	– положительный контрольный образец
К-	– отрицательный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец экстракции
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
ТУ	– технические условия
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза

---

## НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

---

Набор реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* / *S. pneumoniae* / *H. influenzae*» по ТУ 21.20.23-178-09286667-2022.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* / *S. pneumoniae* / *H. influenzae*», а также сокращение Набор реагентов.

---

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

---

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* / *S. pneumoniae* / *H. influenzae*» предназначен для выявления ДНК микроорганизмов, вызывающих тяжелые внебольничные пневмонии (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) в биологическом материале (бронхо-альвеолярный лаваж, мазки со слизистой носо- и ротоглотки, мокрота) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

1.2. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных в разделе инструкции «Дополнительное оборудование и материалы».

1.3. Функциональное назначение: Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (выявление ДНК микроорганизмов, вызывающих тяжелые внебольничные пневмонии (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) методом ПЦР в биологическом материале (бронхо-альвеолярный лаваж, мазки со слизистой носо- и ротоглотки, мокрота)).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала при диагностике лиц с клинической симптоматикой инфекций нижних и верхних дыхательных путей, вызываемых микроорганизмами *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*.

1.5. Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.6. Потенциальные пользователи: Набор реагентов должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

1.7. Применять набор реагентов строго по назначению согласно инструкции по применению.

1.8. Противопоказания к применению: Нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требований инструкции.

---

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

---

### 2.1. Формы выпуска, состав и комплектность

Набор реагентов выпускается в двух формах (состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно). Обе формы предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

**Форма выпуска 1** включает смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом 1,5 или 2,0 мл для дозирования в любые типы пробирок. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Форма может быть использована как для ручной раскапки, так и совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

**Форма выпуска 2** включает смесь для проведения ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по стрипованным (12,5 стрипов по 8 пробирок) пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Таблица 1

### Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
<b>Форма выпуска 1</b>			
ПЦР-смесь M.pne/C.pne/S.pne/H.inf	1,20	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-буфер-Н	0,65	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО M.pne/C.pne/S.pne/H.inf	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ВКО-FL	1,10	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
<b>Форма выпуска 2</b>			
ПЦР-смесь M.pne/C.pne/S.pne/H.inf	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок) <sup>1</sup>	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана в стрипованные пробирки под парафин белого цвета.
ПЦР-буфер-К	1,20	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость красного цвета.
ПКО M.pne/C.pne/S.pne/H.inf	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ВКО-FL	1,10	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

### Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1 или 2)	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде <sup>2</sup> на официальном сайте Производителя: <a href="http://www.nextbio.ru">www.nextbio.ru</a>	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: <a href="http://www.nextbio.ru">www.nextbio.ru</a>	-

<sup>1</sup> Пробирки с голубым парафином не используются.

<sup>2</sup> Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

## 2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на проведении одновременной реакции амплификации участков ДНК выявляемых микроорганизмов (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) и искусственно синтезированной последовательности ДНК ВКО при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке амплифицируются участки ДНК выявляемых микроорганизмов и ДНК искусственно синтезированной последовательности ВКО. Результаты амплификации регистрируются по пяти различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

### Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G <sup>3</sup>	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	ДНК <i>M. pneumoniae</i>	ДНК <i>S. pneumoniae</i>	ДНК <i>S. pneumoniae</i>	ДНК ВКО	ДНК <i>H. influenzae</i>
Область амплификации	putative lipoprotein	ompA (Major outer membrane porin)	Spn9802	искусственно синтезированная последовательность	siaT gene

## 2.3. Техническое обслуживание и ремонт

Набор не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

<sup>3</sup> Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

---

## 3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

---

### 3.1. Внутренний контроль качества

#### 3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать отрицательный контрольный образец (ОКО). Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать отрицательный контроль (К-) и положительный контроль (ПКО М.pne/C.pne/S.pne/H.inf). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

Отрицательный контрольный образец (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК *M. pneumoniae*, ДНК *S. pneumoniae*, ДНК *S. pneumoniae*, ДНК *H. influenzae*. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК *M. pneumoniae* и/или ДНК *S. pneumoniae* и/или ДНК *S. pneumoniae* и/или ДНК *H. influenzae*, и контроля, начиная с этапа экстракции.

Отрицательный контроль (К-) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК *M. pneumoniae*, ДНК *S. pneumoniae*, ДНК *S. pneumoniae*, ДНК *H. influenzae*. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК *M. pneumoniae* и/или ДНК *S. pneumoniae* и/или ДНК *S. pneumoniae* и/или ДНК *H. influenzae*, и контроля, начиная с этапа ПЦР.

В качестве положительного контроля используется реагент ПКО М.pne/C.pne/S.pne/H.inf, входящий в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительного контроля заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

#### 3.1.2. Контроль ингибирования

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО (реагент ВКО-FL), который добавляется в каждый исследуемый образец на этапе экстракции. Результаты тестирования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности для **отрицательных** исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах, отрицательных на наличие ДНК выявляемых микроорганизмов, не обнаружена ДНК ВКО, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции.

### 3.1.3. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09. Также для предотвращения контаминации лаборатории или в качестве мер по деконтаминации рабочих зон рекомендуется использовать раствор для дезактивации нуклеиновых кислот, например, «Олигатор» производства ООО «НекстБио», Россия.

### 3.2. Рекомендуемые контрольные материалы

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контроля качества лабораторных исследований по обнаружению ДНК *M. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*.

---

## 4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

4.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – ВКО-FL. Без использования ВКО-FL невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

4.6. Набор предназначен для профессионального применения. Набор должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

4.7. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».



## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением требований СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку<sup>4</sup>, биологический материал<sup>5</sup>, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

**ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Набор предназначен для однократного применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества образцов (см. раздел «Формы выпуска, состав и комплектность»).

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21).

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

<sup>4</sup> Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

<sup>5</sup> Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не смешивать реагенты разных серий.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.
- При контакте немедленно промыть пораженное место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности, кроме указанных в данном разделе.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

---

## **6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

---

### **6.1. Взятие исследуемого материала**

6.1.1. Емкость для взятия, хранения и транспортировки биологического материала (bronхо-альвеолярный лаваж, мокрота) объемом до 50 мл, однократного применения, стерильная, с завинчивающейся или плотно защелкивающейся крышкой, изготовленная из полипропилена.

6.1.2. Транспортная среда для взятия, транспортировки и хранения мазков со слизистой носоглотки, содержащая буферно-солевой раствор с консервантом и стабилизатором (например, «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков «АмплиПрайм ТСП», РУ № ФСР 2012/14200 или другая, зарегистрированная в РФ).

6.1.3. Зонд-тампон, предназначенный для взятия биологического материала с поверхности слизистых оболочек (полости носа, ротоглотки) однократного применения, стерильный. Рабочая часть зонда может отламываться по имеющейся насечке.

### **6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала**

#### **6.2.1. Предварительная подготовка бронхо-альвеолярного лаваж**

6.2.1.1. Микроцентрифужные одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.

6.2.1.2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

6.2.1.3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 200 мкл.

6.2.1.4. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.

6.2.1.5. Автоматический дозатор переменного объема.

6.2.1.6. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.

6.2.1.7. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 7 000 g.

6.2.1.8. Вортекс.

## **6.2.2. Предварительная подготовка мокроты**

6.2.2.1. Реагент для предобработки мокроты с целью проведения экстракции ДНК.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошел следующий реагент для предобработки мокроты: «Реагент для предобработки слизистого материала «Муколизин» (РУ № ФСР 2011/12082).

6.2.2.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для предобработки мокроты, – согласно инструкции к используемому реагенту.

## **6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов**

6.3.1. Набор реагентов для экстракции нуклеиновых кислот, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (бронхо-альвеолярный лаваж, мазки со слизистой носо- и ротоглотки, мокрота) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;
- набор не относится к экспресс-методам экстракции ДНК;
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 50 мкл.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли «МагноПрайм® ФАСТ-Р» (РУ № РЗН 2020/12971) для экстракции ДНК из образцов мазков со слизистой носо- и ротоглотки и мокроты и «АмплиПрайм РИБО-преп» (РУ № ФСР 2012/14017) для экстракции ДНК из образцов бронхо-альвеолярного лаважа, мазков со слизистой носо- и ротоглотки и мокроты.

6.3.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

## **6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов**

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов (при использовании формы выпуска 1):

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 - 2 мл – для приготовления реакционной смеси.
- 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.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл.

6.4.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.

6.4.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5. Центрифуга-вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и раскапки реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - при использовании формы выпуска 1 в случае приготовления реакционной смеси с использованием автоматической станции.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошла следующая станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей: «Автоматическая станция для экстракции нуклеиновых кислот Microlab STARlet» (ПУ № РЗН 2018/6981).

6.4.8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» планшетного типа, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 со следующими характеристиками:

Таблица 4

**Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции**

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580
ROX	565	585	605	650
Cy5	620	640	660	690
Cy5.5	660	690	705	750

- наличие подогреваемой крышки с температурой более 100 °С;

- точность поддержания температуры  $\leq \pm 0,4$  °С;

- скорость нагрева не менее 2 °С/сек;

- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»: C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (ПУ № ФСЗ 2008/03399), ДТпрайм (ПУ № ФСР 2011/10229).

6.4.9. Холодильник от 2 до 8 °С.

6.4.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

## 7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служит:

- бронхо-альвеолярный лаваж;
- мазки со слизистой носо- и ротоглотки;
- мокрота.

**ВНИМАНИЕ!** Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки рекомендуется совмещать в одной пробирке и исследовать как один образец. Для этого берут мазки разными зондами сначала со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом рабочие концы зондов после взятия мазков помещаются в одну пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец. Если зонд не остается в пробирке со средой, то необходимо тщательно смыть материал, интенсивно прокручивая зонд в среде не менее 10 секунд.

Взятие, предварительную обработку, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с нижеперечисленными требованиями, несоблюдение которых может привести к получению некорректных результатов исследования.

### 7.1. Бронхо-альвеолярный лаваж

Взятие материала осуществляют в одноразовые плотно завинчивающиеся емкости из полипропилена объемом 50 мл.

Условия хранения материала и предварительно обработанных проб:

- при температуре от 2 до 8 °С — в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С — в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

#### 7.1.1. Предварительная обработка

Перемешать материал переворачиванием емкости. Внести 1 мл образца в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром, промаркировать и центрифугировать 10 мин при 7 000 g. Затем аккуратно удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, оставив осадок и 100 мкл жидкого образца. Осадок перемешать с жидкостью.

### 7.2. Мазки из полости носа

Взятие материала провести из полости носа с помощью стерильного зонда-тампона в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 72 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 14 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев.

Допускается лишь однократное замораживание–оттаивание материала.

### **7.3. Мазки со слизистой оболочки ротоглотки**

Взятие материала провести с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки с помощью одноразового стерильного зонда-тампона в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 72 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 14 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев.

Допускается лишь однократное замораживание–оттаивание материала.

### **7.4. Мокрота**

#### **7.4.1. Взятие материала**

Отобрать мокроту в количестве не менее 1,0 мл в одноразовый стерильный контейнер с широким горлом и завинчивающейся крышкой.

Условия хранения и перевозки материала:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание–оттаивание материала.

#### **7.4.2. Предварительная обработка**

Необходимо провести разжижение мокроты, используя реагент для предобработки мокроты с целью проведения экстракции нуклеиновых кислот, в соответствии с инструкцией по использованию данного реагента.

Условия хранения предварительно обработанных проб мокроты аналогичны условиям хранения материала до предобработки.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории<sup>6</sup>:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75 %.

### 8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

**ВНИМАНИЕ!** При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

**ВНИМАНИЕ!** Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОКО) в одном повторе.

В процессе экстракции ДНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем реагента ВКО-FL – **10 мкл** в пробирку для ОКО, а также в каждую пробирку с исследуемыми образцами;
- объем исследуемого образца – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **50 мкл<sup>7</sup>** (при использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп») или **100 мкл** (при использовании набора реагентов «МагноПрайм® ФАСТ-Р»).

### 8.2. Подготовка реагентов для амплификации

#### 8.2.1. При использовании формы выпуска 1.

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

**ВНИМАНИЕ!** В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.1.1. Рассчитать объемы реагентов, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 5

**Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси**

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь M.pne/C.pne/S.pne/H.inf	<b>10*(N+1)</b>	<b>N</b> – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
ПЦР-буфер-Н	<b>5*(N+1)</b>	

<sup>6</sup> Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

<sup>7</sup> При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.

8.2.1.2. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью M.pne/C.pne/S.pne/H.inf** и **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.

8.2.1.3. Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.1.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

8.2.1.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси.

**ВНИМАНИЕ!** Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

### **8.2.2. При использовании формы выпуска 2.**

8.2.2.1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью M.pne/C.pne/S.pne/H.inf** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

8.2.2.2. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

8.2.2.3. На поверхность парафина внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

### **8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции**

**ВНИМАНИЕ!** При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

**ВНИМАНИЕ!** При ручном анализе (качественный формат) программирование и запуск амплификатора проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору. При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл** проб ДНК, полученных в результате экстракции из тестируемых образцов.

8.3.2. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью контрольные образцы:

а) Положительный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **ПКО** внести **10 мкл ПКО M.pne /C.pne /S.pne /H.inf**.

б) Отрицательный контроль экстракции – в одну пробирку для образца **ОКО** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

в) Отрицательный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл реагента К-**.

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу б).



**Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала**

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G <sup>8</sup> , ROX, Cy5, Cy5.5	

**Примечание** - С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам, указанным в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

8.3.4. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

8.3.6. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.7. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

**8.4. Анализ и вычисление результатов**

Анализ и обработку результатов можно проводить:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>;

- в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

**ВНИМАНИЕ!** При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора (см. вкладыш к набору и инструкцию по применению амплификатора).

<sup>8</sup> Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по пяти каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

### Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
Продукт амплификации	ДНК <i>M. pneumoniae</i>	ДНК <i>C. pneumoniae</i>	ДНК <i>S. pneumoniae</i>	ДНК ВКО	ДНК <i>H. influenzae</i>

### 8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- вручную в соответствии с таблицей 8 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 9;

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 8 и 9 соответственно.

Таблица 8

### Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров <b>FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 не определено или определено выше граничного</b> <sup>9</sup>	<b>Результат Невалидный!</b> Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналам для флуорофоров <b>FAM</b> и/или <b>R6G</b> и/или <b>ROX</b> и/или <b>Cy5.5 определено не выше граничного</b> . При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналу для флуорофора <b>Cy5</b> не учитывается	<b>ДНК <i>M. pneumoniae</i> и/или ДНК <i>C. pneumoniae</i> и/или ДНК <i>S. pneumoniae</i> и/или ДНК <i>H. influenzae</i> обнаружена</b> соответственно
Значение Ct по каналам для флуорофоров <b>FAM, R6G, ROX, Cy5.5 не определено или определено выше граничного</b> , при этом значение Ct по каналу для флуорофора <b>Cy5 определено не выше граничного</b>	<b>ДНК соответствующих выявляемых микроорганизмов не обнаружена</b>

Таблица 9

### Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора				
	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует	Значение Ct отсутствует	Значение Ct отсутствует	Определено значение Ct не выше граничного <sup>8</sup>	Значение Ct отсутствует
ПКО (положительный контроль ПЦР)	Определено значение Ct не выше граничного	Определено значение Ct не выше граничного	Определено значение Ct не выше граничного	Не определяется	Определено значение Ct не выше граничного
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует				

<sup>9</sup> Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

## **8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению**

8.6.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК выявляемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофора FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК выявляемых микроорганизмов, начиная с этапа амплификации ДНК.

8.6.3. Для положительного контрольного образца (ПКО) по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX или Cy5.5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. Вероятна ошибка на этапе амплификации, необходимо провести повторно этап ПЦР для всех отрицательных образцов.

8.6.4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.6.5. В случае получения невалидных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести взятие, предварительную подготовку и исследование образца.

## **8.7. Диагностическое значение полученного результата**

ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента. Результаты, полученные при использовании набора, следует рассматривать и интерпретировать в сочетании с данными других клинических и лабораторных исследований.

## 9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

### 9.1. Предел обнаружения<sup>10</sup>

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* / *S. pneumoniae* / *H. influenzae*» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 10).

Значения характеристики, указанные в таблице 10, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 10

Предел обнаружения набора

Микроорганизм	Биоматериал	Набор для экстракции ДНК	Предел обнаружения по Probit 95%, ГЭ/мл	95%-ый доверительный интервал, ГЭ/мл
<i>M. pneumoniae</i>	Бронхо-альвеолярный лаваж	АмплиПрайм РИБО-преп	1×10 <sup>3</sup>	8,21×10 <sup>2</sup> -2,36×10 <sup>3</sup>
<i>C. pneumoniae</i>				5,25×10 <sup>2</sup> -1,05×10 <sup>3</sup>
<i>S. pneumoniae</i>				6,33×10 <sup>2</sup> -1,47×10 <sup>3</sup>
<i>H. influenzae</i>				8,21×10 <sup>2</sup> -2,36×10 <sup>3</sup>
<i>M. pneumoniae</i>	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	МагноПрайм® ФАСТ-Р	1×10 <sup>3</sup>	5,25×10 <sup>2</sup> -1,05×10 <sup>3</sup>
<i>C. pneumoniae</i>		АмплиПрайм РИБО-преп		6,33×10 <sup>2</sup> -1,47×10 <sup>3</sup>
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		8,21×10 <sup>2</sup> -2,36×10 <sup>3</sup>
<i>S. pneumoniae</i>		АмплиПрайм РИБО-преп		5,25×10 <sup>2</sup> -1,05×10 <sup>3</sup>
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		6,33×10 <sup>2</sup> -1,47×10 <sup>3</sup>
<i>H. influenzae</i>		АмплиПрайм РИБО-преп		8,21×10 <sup>2</sup> -2,36×10 <sup>3</sup>
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		6,33×10 <sup>2</sup> -1,47×10 <sup>3</sup>
<i>M. pneumoniae</i>		Мокрота		МагноПрайм® ФАСТ-Р
	АмплиПрайм РИБО-преп		8,21×10 <sup>2</sup> -2,36×10 <sup>3</sup>	
<i>C. pneumoniae</i>	МагноПрайм® ФАСТ-Р		5,25×10 <sup>2</sup> -1,05×10 <sup>3</sup>	
	АмплиПрайм РИБО-преп		6,33×10 <sup>2</sup> -1,47×10 <sup>3</sup>	
<i>S. pneumoniae</i>	МагноПрайм® ФАСТ-Р		5,25×10 <sup>2</sup> -1,05×10 <sup>3</sup>	
	АмплиПрайм РИБО-преп		8,21×10 <sup>2</sup> -2,36×10 <sup>3</sup>	
<i>H. influenzae</i>	МагноПрайм® ФАСТ-Р		5,25×10 <sup>2</sup> -1,05×10 <sup>3</sup>	
	АмплиПрайм РИБО-преп		6,33×10 <sup>2</sup> -1,47×10 <sup>3</sup>	

### 9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает только фрагменты ДНК *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*.

Аналитическая специфичность набора «АмплиПрайм® *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* / *S. pneumoniae* / *H. influenzae*» оценивалась тестированием ДНК микроорганизмов (см. таблицу 11) и геномной ДНК человека. ДНК микроорганизмов в концентрации не менее 1×10<sup>6</sup> копий/мл и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие ДНК выявляемых микроорганизмов.

<sup>10</sup> Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК выявляемого возбудителя, при которой 95% тестов дают положительный результат).

**Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности**

Микроорганизмы	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bordetella parapertussis</i>
<i>Neisseria sicca</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
<i>Neisseria mucosa</i>	<i>Bordetella holmesii</i>
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Escherichia coli</i>	-

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и геномной ДНК человека с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

**9.3. Воспроизводимость и повторяемость измерения**

Воспроизводимость и повторяемость результатов с использованием набора оценивали путем тестирования модельных образцов. Модельные образцы были приготовлены путем контаминации образцов биоматериала, предусмотренного назначением набора, стандартными образцами предприятия, содержащими ДНК выявляемых микроорганизмов. Были протестированы образцы в двух концентрациях ДНК выявляемых микроорганизмов, одна из которых соответствовала пределу обнаружения набора ( $1 \times 10^3$  ГЭ/мл), а вторая двукратно превышала предел обнаружения ( $2 \times 10^3$  ГЭ/мл). Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

При оценке повторяемости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения пороговых циклов для ДНК выявляемых микроорганизмов, не превышал 5 %.

При оценке воспроизводимости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения пороговых циклов для ДНК выявляемых микроорганизмов, не превышал 10 %.

**9.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность**

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* / *S. pneumoniae* / *H. Influenzae*» были использованы образцы каждого вида биоматериала, предусмотренного назначением набора реагентов, в количестве, указанном в таблице 12.

В качестве наборов сравнения, с помощью которых устанавливали наличие/отсутствие ДНК *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, использовались наборы реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydia pneumoniae*-FL» (ПУ № ФСР 2012/13957) и «АмплиСенс® Пневмо-квант-FL» (ПУ № РЗН 2022/16467).

**Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора реагентов «АмплиПрайм® *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* / *S. pneumoniae* / *H. Influenzae*»**

Исследуемые образцы			Результаты тестирования				
			Образцы	Тестируемый набор «АмплиПрайм® <i>M. pneumoniae</i> / <i>C. pneumoniae</i> / <i>S. pneumoniae</i> / <i>H. Influenzae</i> »		Наборы сравнения	
Тип	Возбудитель	Всего образцов		Форма выпуска 1	Форма выпуска 2	«АмплиСенс® <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> -FL»	«АмплиСенс® Пневмо-квант-FL»
Бронхо-альвеолярный лаваж	<i>M. pneumoniae</i>	170	Положительные	30	30	30	Не выявляет
			Отрицательные	140	140	140	Не выявляет
	<i>C. pneumoniae</i>		Положительные	30	30	30	Не выявляет
			Отрицательные	140	140	140	Не выявляет
	<i>S. pneumoniae</i>		Положительные	30	30	Не выявляет	30
			Отрицательные	140	140	Не выявляет	140
			<i>H. Influenzae</i>	Положительные	30	30	Не выявляет
Отрицательные	140	140	Не выявляет	140			
Мазки со слизистой носоглотки	<i>M. pneumoniae</i>	420	Положительные	60	60	60	Не выявляет
			Отрицательные	360	360	360	Не выявляет
	<i>C. pneumoniae</i>		Положительные	60	60	60	Не выявляет
			Отрицательные	360	360	360	Не выявляет
	<i>S. pneumoniae</i>		Положительные	100	100	Не выявляет	100
			Отрицательные	320	320	Не выявляет	320
			<i>H. Influenzae</i>	Положительные	100	100	Не выявляет
Отрицательные	320	320	Не выявляет	320			
Мокрота	<i>M. pneumoniae</i>	340	Положительные	60	60	60	Не выявляет
			Отрицательные	280	280	280	Не выявляет
	<i>C. pneumoniae</i>		Положительные	60	60	60	Не выявляет
			Отрицательные	280	280	280	Не выявляет
	<i>S. pneumoniae</i>		Положительные	60	60	Не выявляет	60
			Отрицательные	280	280	Не выявляет	280
			<i>H. Influenzae</i>	Положительные	60	60	Не выявляет
Отрицательные	280	280	Не выявляет	280			

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* / *S. pneumoniae* / *H. Influenzae*» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 13.

**Диагностические характеристики набора реагентов  
«АмплиПрайм® *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* / *S. pneumoniae* / *H. Influenzae*»**

Биоматериал	Возбудитель	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность
Бронхо-альвеолярный лаваж	<i>M. pneumoniae</i>	100 % (97,40 % – 100 %)	100 % (88,43 % - 100 %)
	<i>C. pneumoniae</i>	100 % (97,40 % – 100 %)	100 % (88,43 % - 100 %)
	<i>S. pneumoniae</i>	100 % (97,40 % – 100 %)	100 % (88,43 % - 100 %)
	<i>H. Influenzae</i>	100 % (97,40 % – 100 %)	100 % (88,43 % - 100 %)
Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	<i>M. pneumoniae</i>	100 % (98,98 % – 100 %)	100 % (94,04 % - 100 %)
	<i>C. pneumoniae</i>	100 % (98,98 % – 100 %)	100 % (94,04 % - 100 %)
	<i>S. pneumoniae</i>	100 % (98,85 % – 100 %)	100 % (96,38 % - 100 %)
	<i>H. Influenzae</i>	100 % (98,85 % – 100 %)	100 % (96,38 % - 100 %)
Мокрота	<i>M. pneumoniae</i>	100 % (98,69 % – 100 %)	100 % (94,04 % – 100 %)
	<i>C. pneumoniae</i>	100 % (98,69 % – 100 %)	100 % (94,04 % – 100 %)
	<i>S. pneumoniae</i>	100 % (98,69 % – 100 %)	100 % (94,04 % – 100 %)
	<i>H. Influenzae</i>	100 % (98,69 % – 100 %)	100 % (94,04 % – 100 %)

### 9.5. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* / *S. pneumoniae* / *H. influenzae*» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 14, в максимально возможной концентрации.

Таблица 14

**Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора  
«АмплиПрайм® *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* / *S. pneumoniae* / *H. influenzae*»**

Биоматериал	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
Бронхо-альвеолярный лаваж	гемоглобин	200 мг/мл
	муцин	2,3 мг/мл
Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	гемоглобин	200 мг/мл
	муцин	2,3 мг/мл
	ксилومتазолин	0,01 %
	мирамистин	0,001 % действующего вещества
	хлоргексидин	0,1 % действующего вещества
Мокрота	гемоглобин	200 мг/мл
	муцин	2,3 мг/мл
	мирамистин	0,001 % действующего вещества
	хлоргексидин	0,1 % действующего вещества

Также не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала ДНК человека в концентрации  $1,0 \times 10^8$  копий/мл.

---

## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

---

### 10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

### 10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Не допускается замораживание реагентов.

Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 3 суток.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

### 10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора. Не допускается замораживание реагентов.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси *M.pne/C.pne/S.pne/H.inf* и ПЦР-буфера-Н, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

---

## 11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

---

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® *M. pneumoniae / C. pneumoniae / S. pneumoniae / H. influenzae*» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

При выявлении нежелательных реакций при использовании набора, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в Российской Федерации – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: [www.nextbio.ru](http://www.nextbio.ru).



## 12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Не допускать попадания солнечного света
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		