

Набор реагентов для выявления и дифференциации РНК субтипов Н5, Н7, Н9 вируса гриппа А методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»
«АмплиПрайм® Грипп А Н5/Н7/Н9» по ТУ 20.59.52-246-09286667-2024

АмплиПрайм® Грипп А Н5/Н7/Н9

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ	5
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	5
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	8
3.1. Внутренний контроль качества	8
3.2. Рекомендуемые контрольные материалы	9
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	9
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	10
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	11
6.1. Взятие исследуемого материала	11
6.2. Экстракция НК из исследуемых образцов	11
6.3. Обратная транскрипция, амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	12
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	13
7.1. Мазки со слизистой оболочки носоглотки	13
7.2. Мазки со слизистой оболочки ротоглотки	14
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	14
8.1. Экстракция НК из исследуемого материала	14
8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР	15
8.3. Внесение проб НК, проведение ОТ-ПЦР и детекции	16
8.4. Анализ и вычисление результатов	17
8.5. Интерпретация результатов	17
8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению	18
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	22
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

Ct	– Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	– внутренний контрольный образец
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
кДНК	– комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
К-	– отрицательный контрольный образец ОТ-ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец экстракции
ОТ-ПЦР	– обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция
ТУ	– технические условия
ПКО	– положительный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РНКаза	– рибонуклеаза
РУ	– регистрационное удостоверение
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления и дифференциации РНК субтипов H5, H7, H9 вируса гриппа А методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Грипп А H5/H7/H9» по ТУ 20.59.52-246-09286667-2024.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Грипп А H5/H7/H9», а также сокращение Набор реагентов.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп (*Grippus, Influenza*) — острая инфекционная болезнь с аэрозольным механизмом передачи возбудителя, характеризующаяся массовым распространением, кратковременной лихорадкой, интоксикацией и поражением респираторного тракта.

В настоящее время на основе свойств гемагглютинаина выделяют 18 подтипов вируса гриппа А (обозначаемые как H1, H2, ..., H18). Белок нейраминидазы имеет и 11 вариантов (N1, N2, ..., N11). Вирусы гриппа А широко распространены в природе среди разных видов птиц и млекопитающих. Характерной особенностью вирусов гриппа, особенно типа А, является изменчивость поверхностных гликопротеинов HA и NA [1].

Известны спорадические, хотя и редкие, случаи инфицирования людей вирусами гриппа птиц и другими зоонозными вирусами гриппа. Прямой или опосредованный контакт с инфицированными животными является фактором риска заражения человека. Циркулирующие в настоящее время зоонозные вирусы гриппа не обнаруживают способности к устойчивой передаче от человека человеку.

Основным фактором риска инфицирования человека вирусами гриппа птиц является контакт с инфицированной живой или мертвой домашней птицей или объектами окружающей среды, на которых присутствует вирус, в частности на рынках живой птицы. Фактические данные, которые свидетельствовали бы о возможности заражения человека вирусами A(H5), A(H7N9) или другими вирусами гриппа птиц в результате употребления в пищу прошедших надлежащую термическую обработку мяса или яиц домашней птицы, отсутствуют. Известно о нескольких случаях заболевания людей гриппом A(H5N1) в результате употребления блюд, изготовленных из сырой зараженной крови домашней птицы [3].

Анализ вирусов гриппа H5 от птиц и погибших животных показал, что возбудитель приобретает мутации, которые позволяют ему эффективно приспосабливаться к новым хозяевам, преодолевать межвидовой барьер, что является первым шагом на пути формирования пандемического штамма. В настоящее время, по данным ВОЗ, случаев инфицирования людей таким вирусом немного, он не передается от человека к человеку. Однако учитывая беспрецедентные масштабы распространения вируса по миру, грипп H5, H7, H9 представляет собой реальную угрозу, которая требует тщательного мониторинга и принятия ответных мер [2].

Список литературы:

1. Грипп у взрослых. Клинические рекомендации. 2021.
2. Даниленко Д.М., Комиссаров А.Б., Передерий А.А., Фадеев А.В., Лиознов Д.А. Высокопатогенный грипп H5: риски формирования нового пандемического штамма. Журнал Инфектологии Том 15, №4, 2023. DOI: 10.22625/2072-6732-2023-15-4-14-24.
3. Грипп птиц и другие виды зоонозного гриппа [Электронный ресурс] // Всемирная организация здравоохранения : Центр СМИ. URL : [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(avian-and-other-zoonotic\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(avian-and-other-zoonotic)) (дата обращения: 31.10.23)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® Грипп А H5/H7/H9» предназначен для выявления и дифференциации РНК субтипов H5, H7, H9 вируса гриппа А в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки) методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

1.2. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, 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 и дифференциация РНК субтипов H5, H7, H9 вируса гриппа А в биологическом материале человека).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на инфекции респираторного тракта вне зависимости от формы и стадии заболевания. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

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

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Формы выпуска, состав и комплектность

Набор выпускается в двух формах (состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно). Все формы предназначены для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции НК, 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 и роторного 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
Форма выпуска 1			
ПЦР-реагенты			
ПЦР-смесь Грипп А 5/7/9	1,20	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер С	0,65	1 пробирка	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.
Тaq полимеразы	0,12	1 пробирка	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза R	0,03	1 пробирка	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
Контроли			
ПКО Грипп А 5/7/9	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ВКО R	1,2	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контроль экстракции. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ОТ-ПЦР. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь			
ПЦР-смесь Грипп А 5/7/9	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок) ¹	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, распапана в стрипованные пробирки под парафин белого цвета.
ПЦР-реагенты			
Буфер D	1,2	1 пробирка	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.
Тaq полимеразы	0,12	1 пробирка	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза R	0,03	1 пробирка	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
Контроли			
ПКО Грипп А 5/7/9	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ВКО R	1,2	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контроль экстракции. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ОТ-ПЦР. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1 или 2)	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде ² на официальном сайте Производителя: nextbio.ru	-
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: nextbio.ru	-

¹ Пробирки с голубым парафином не используются.² Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО R), последующим проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемых субтипов H5, H7, H9 вируса гриппа А и искусственно синтезированной последовательности кДНК ВКО R с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». ВКО R позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние потенциальных ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК проводится обратная транскрипция РНК с помощью фермента ревертазы и последующая амплификация участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР 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 в одной пробирке одновременно амплифицируются участки кДНК *Influenza virus A* субтипов H5, H7, H9 и последовательность ВКО R. Результаты амплификации регистрируются по четырем различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие НК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ³	ROX	Cy5
НК-мишень	РНК вируса гриппа А субтипа H5	РНК вируса гриппа А субтипа H7	РНК вируса гриппа А субтипа H9	ВКО (экзогенный ВКО)
Область амплификации	4S hemagglutinin (HA) gene	4S hemagglutinin (HA) gene	4S hemagglutinin (HA) gene	Искусственно синтезированная последовательность

2.3. Техническое обслуживание и ремонт

Набор не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

³ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

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 контроль экстракции (ОКО), а каждая индивидуальная постановка ОТ-ПЦР отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-) и положительный контрольный образец (ПКО Грипп А 5/7/9). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

В качестве отрицательного контроля этапа экстракции используется реагент ОКО, входящий в состав набора. Отрицательный контроль тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться НК выявляемых вирусов. В случае несоответствия результата для контроля заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа экстракции.

Отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-) тестируется, начиная с этапа ОТ-ПЦР, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем ОТ-ПЦР не должна детектироваться НК выявляемых вирусов. 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 НК выявляемых вирусов, и контроля, начиная с этапа ОТ-ПЦР.

В качестве положительного контрольного образца используется реагент ПКО Грипп А 5/7/9, 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 ОТ-ПЦР.

3.1.2. Контроль ингибирования

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции РНК, обратной транскрипции и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО, содержащего РНК, который добавляется в каждый исследуемый и контрольный образец на этапе экстракции НК. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности для положительных и отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах не обнаружена НК анализируемых вирусов и РНК ВКО, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции. В исследуемых образцах, в которых обнаружена НК выявляемых вирусов, допускается наличие или отсутствие РНК ВКО.

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 регламентируемыми 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 РНК субтипов H5, H7, H9 вируса гриппа А (*Influenza virus A*).

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 и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора реагентов возможно ПЦР-исследование только проб РНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – ВКО R, входящим в состав набора. Без использования ВКО R невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. 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).

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

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

4.8. Не применять набор при нарушении целостности упаковки.

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 СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», 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». Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

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, упаковку⁴, биологический материал⁵, 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).

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

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

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не смешивать реагенты разных партий.
- 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 этом 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. Транспортная среда для взятия, транспортировки и хранения мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, содержащая раствор фосфатного буфера с добавлением консерванта и криоконсерванта (например, «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков «АмплиПрайм ТСР», РУ № ФСР 2012/14200 или другая, зарегистрированная в РФ).

6.1.2. Зонд-тампон для взятия биологического материала с поверхности слизистой оболочки носо- и ротоглотки однократного применения, стерильный, изготовленный из полипропилена/полистирола с вязкой или хлопком.

6.2. Экстракция НК из исследуемых образцов

6.2.1. Набор реагентов для экстракции НК, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять НК из биологического материала (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки) для последующего исследования методом ОТ-ПЦР;
- набор не относится к экспресс-методам экстракции НК;
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной НК в объеме не менее 50 мкл.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие наборы реагентов для экстракции НК: «МагноПрайм® ФАСТ-Р» (РУ № РЗН 2020/12971), «АмплиПрайм РИБО-преп» (РУ № ФСР 2012/14017).

6.2.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции НК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции НК.

6.3. Обратная транскрипция, амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.3.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКа/РНКа, следующих видов:

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – 2,0 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 – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа;
- 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.

6.3.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКа/РНКа, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 1000 мкл.

6.3.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

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

6.3.5. Центрифуга-вортекс.

6.3.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.3.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - при работе с формой выпуска 1 в случае приготовления реакционных смесей с использованием автоматической станции.

6.3.8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного либо планшетного типа, зарегистрированные в РФ и соответствующие следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX и Cy5 с характеристиками, указанными в таблице 4:

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

- для приборов планшетного типа верхняя граница температурного диапазона не менее 99 °С;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,5$ °С;
- скорость нагрева не менее 1,5 °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»: Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399), ДТпрайм (РУ № ФСР 2011/10229), Lengen-96 (РУ № РЗН 2023/21155).

6.3.9. Холодильник, поддерживающий температурный режим от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

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

6.3.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат:

- мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки.

ВНИМАНИЕ! Мазки со слизистой оболочки 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, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с нижеперечисленными требованиями, несоблюдение которых может привести к получению некорректных результатов исследования.

7.1. Мазки со слизистой оболочки носоглотки

Взятие материала провести из полости носа 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;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.2. 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;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинично-диагностической лаборатории⁶:

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

8.1. Экстракция НК из исследуемого материала

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

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

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

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

- объем реагента ВКО R – **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 НК, – **50 мкл**⁷ (при использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп») или **100 мкл** (при использовании наборов реагентов «МагноПрайм® ФАСТ-Р»).

⁶ 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».

⁷ При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.

8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР

8.2.1. При использовании формы выпуска 1

ВНИМАНИЕ! Необходимо минимизировать время нахождения Таq полимеразы и Ревертазы R при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-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 реакционных смесей

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь Грипп А 5/7/9	$10,0 \cdot (N+1)$	N – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Буфер С	$5,0 \cdot (N+1)$	
Таq полимеразы	$1,0 \cdot (N+1)$	
Ревертаза R	$0,25 \cdot (N+1)$	

8.2.1.2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами (см. таблицу 5), осадить капли на вортексе.

8.2.1.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, 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 для проведения ОТ-ПЦР НК исследуемых и контрольных образцов.

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционных смесей хранению не подлежат.

8.2.2. При использовании формы выпуска 2

ВНИМАНИЕ! Необходимо минимизировать время нахождения Таq полимеразы и Ревертазы R при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-ПЦР.

8.2.2.1. Рассчитать объемы реагентов, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 6). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 6

Расчет объемов компонентов реакционных смесей

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
Буфер D	$10,0 \cdot (N+1)$	N – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Таq полимеразы	$1,0 \cdot (N+1)$	
Ревертаза R	$0,25 \cdot (N+1)$	

8.2.2.2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами (см. таблицу 6), осадить капли на вортексе.

8.2.2.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.2.4. Отобрать необходимое количество стрипов с **ПЦР-смесью Грипп А 5/7/9**, для проведения ОТ-ПЦР НК исследуемых и контрольных образцов.

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

8.2.2.6. На поверхность парафина внести по **10 мкл** приготовленной **реакционной смеси**, при этом она не должна проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционных смесей хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб НК, проведение ОТ-ПЦР и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб НК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционные смеси.

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе 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 НК**, полученных в результате экстракции.

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

а) положительный контроль ОТ-ПЦР – в одну пробирку для образца **ПК** внести по **10 мкл** реагента **ПКО Грипп А 5/7/9**.

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

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

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после внесения НК-проб и контролей в реакционные смеси.

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 7).

Таблица 7

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, ROX, Cy5	

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 ОТ-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 ОТ-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 кДНК 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).

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по четырём каналам детекции (см. таблицу 8).

Таблица 8

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуороформа	FAM	R6G	ROX	Cy5
Продукт амплификации	РНК вируса гриппа А субтипа H5	РНК вируса гриппа А субтипа H7	РНК вируса гриппа А субтипа H9	ВКО (экзогенный ВКО)

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

– вручную в соответствии с таблицей 9 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 10;

– 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, представлен в таблицах 9 и 10 соответственно.

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX и Cy5 не определено или определено выше граничного ⁸ .	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM и/или R6G, и/или ROX определено не выше граничного. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 не учитывается.	РНК вируса гриппа А субтипа Н5, и/или РНК вируса гриппа А субтипа Н7, и/или РНК вируса гриппа А субтипа Н9 обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM и/или R6G, и/или ROX не определено или определено выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 определено не выше граничного.	РНК вируса гриппа А субтипа Н5, и/или РНК вируса гриппа А субтипа Н7, и/или РНК вируса гриппа А субтипа Н9 не обнаружена

Таблица 10

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора			
	FAM	R6G	ROX	Cy5
ПКО Грипп А 5/7/9	Значение Ct определено не выше граничного ⁸			Значение Ct отсутствует
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует			Значение Ct определено не выше граничного
К- (отрицательный контроль ОТ-ПЦР)	Значение Ct отсутствует			

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 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 для всех образцов, начиная с этапа экстракции НК.

8.6.2. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G, и/или ROX, и/или Cy5 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 исследование для всех образцов, начиная с этапа амплификации НК.

8.6.3. Для положительного контрольного образца (ПКО Грипп А 5/7/9) по каналу для флуорофоров FAM и/или R6G, и/или ROX наблюдается превышение граничного значения. Вероятна ошибка на этапе амплификации, необходимо провести повторно этап ОТ-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 Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

8.6.5. В случае получения невалидных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции НК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести взятие 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 обнаружения⁹

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® Грипп А Н5/Н7/Н9» был определен с использованием пробит-анализа с 95 %-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 11).

Значения характеристики, указанные в таблице 11, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 11

Предел обнаружения набора

Вирус	Биоматериал	Набор для экстракции НК	Предел обнаружения по Probit 95 %, копий/мл	95 %-ый доверительный интервал, копий/мл
Грипп А субтип Н5	Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	«МагноПрайм® ФАСТ-Р»	1×10 ³	0,871×10 ³ — 1,360×10 ³
		«АмплиПрайм РИБО-преп»		0,812×10 ³ — 1,280×10 ³
Грипп А субтип Н7	Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	«МагноПрайм® ФАСТ-Р»		0,837×10 ³ — 1,260×10 ³
		«АмплиПрайм РИБО-преп»		0,809×10 ³ — 1,240×10 ³
Грипп А субтип Н9	Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	«МагноПрайм® ФАСТ-Р»		0,817×10 ³ — 1,220×10 ³
		«АмплиПрайм РИБО-преп»		0,846×10 ³ — 1,330×10 ³

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов «АмплиПрайм® Грипп А Н5/Н7/Н9» обнаруживает фрагменты РНК субтипов Н5, Н7, Н9 вируса гриппа А.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК штаммов микроорганизмов, вирусов (см. таблицу 12) и геномной ДНК человека. НК штаммов микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее 1×10⁶ копий/мл, и геномную ДНК человека в концентрации 5×10⁶ кл/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие РНК субтипов Н5, Н7, Н9 вируса гриппа А.

Таблица 12

Штаммы микроорганизмов, вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Штаммы микроорганизмов, вирусы	
штамм <i>Bordetella parapertussis</i> №17903	штамм вируса Коксаки А
штамм <i>Bordetella pertussis</i> №38	штамм вируса Коксаки В
штамм <i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	штамм вируса ECHO-6
штамм <i>Bordetella holmesii</i>	штамм вируса ECHO-11
штамм <i>Haemophilus influenzae</i> mun «b» 1420	<i>Human coronavirus</i> OC43
штамм <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Human coronavirus</i> NL63
штамм <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> №418	<i>Human respiratory syncytial virus</i>
штамм <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	<i>Human rhinovirus</i>
штамм <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>Human parainfluenza virus</i>
штамм <i>Pseudomonas aeruginosa</i> №453	<i>Human adenovirus</i>
штамм <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Human bocavirus</i>
штамм <i>Legionella pneumophila</i> ATCC33152	<i>Human metapneumovirus</i>

⁹ Предел обнаружения – 95 %-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация кДНК выявляемых возбудителей, при которой 95 % тестов дают положительный результат).

Штаммы микроорганизмов, вирусы	
штамм вируса гриппа тип A(H0N1) A/Киев/3304/84	<i>Human coronavirus 229E</i>
штамм вируса гриппа тип A(H1N1)pdm09 A//Виктория/4897/22	<i>Human coronavirus HKU1</i>
штамм вируса гриппа тип A(H3N2) A//Дарвин/9/21	<i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2</i>
штамм вируса гриппа тип A(H2N2) A/Ленинград/549/80	<i>Epstein-Barr virus</i>
штамм вируса гриппа тип В В/Австрия/1359417/21	<i>Human herpesvirus 6B</i>
штамм вируса гриппа тип В В/Пхукет/3073/13	<i>Human Cytomegalovirus</i>
штамм вируса гриппа тип A(H5N1) A/NIBRG-14	штамм вируса гриппа тип A(H9N2) A/Гонконг /1073/99
штамм вируса гриппа тип A(H7N9) A/Шанхай /2/2013	-

При тестировании образцов НК вышеперечисленных штаммов микроорганизмов, вирусов и геномной ДНК человека, а также НК выявляемых вирусов с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

9.3. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость измерений оценивали путем тестирования модельных образцов, содержащих НК выявляемых субтипов в двух концентрациях (см. таблицу 13 и 14).

Модельные образцы были приготовлены разведением стандартных образцов предприятия, содержащих НК выявляемых субтипов, на биологическом материале. Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию НК, ОТ-ПЦР и детекцию результатов).

Таблица 13

Повторяемость измерения

Образец	Канал для флуорофора	Концентрация, копий/мл	Среднее значение порогового цикла, C _{тср}		Стандартное отклонение (SD)		Коэффициент вариации (CV), %	
			«МагноПрайм® ФАСТ-Р»	«АмплиПрайм РИБО-преп»	«МагноПрайм® ФАСТ-Р»	«АмплиПрайм РИБО-преп»	«МагноПрайм® ФАСТ-Р»	«АмплиПрайм РИБО-преп»
Форма выпуска 1								
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	FAM	1×10 ³	35,77	36,22	0,59	0,65	1,65	1,80
		2×10 ³	38,47	38,22	0,72	0,74	1,87	1,95
	R6G	1×10 ³	35,90	36,21	0,61	0,71	1,69	1,97
		2×10 ³	38,17	38,17	0,82	0,76	2,14	1,98
	ROX	1×10 ³	34,84	34,85	0,56	0,66	1,61	1,89
		2×10 ³	37,25	37,22	0,70	0,68	1,87	1,82
	Cy5	1×10 ³	26,83	26,80	0,26	0,32	0,97	1,19
		2×10 ³	26,89	26,85	0,23	0,26	0,86	0,97
Форма выпуска 2								
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	FAM	1×10 ³	36,13	36,19	0,56	0,56	1,54	1,56
		2×10 ³	38,38	38,20	0,74	0,73	1,94	1,92
	R6G	1×10 ³	36,07	36,01	0,59	0,53	1,62	1,47
		2×10 ³	38,34	38,03	0,72	0,70	1,88	1,84
	ROX	1×10 ³	34,82	34,99	0,63	0,59	1,82	1,69
		2×10 ³	37,49	37,28	0,73	0,76	1,94	2,05
	Cy5	1×10 ³	27,53	27,52	0,26	0,27	0,95	0,98
		2×10 ³	27,43	27,55	0,29	0,30	1,06	1,10

Воспроизводимость измерения

Образец	Канал для флуорофора	Концентрация, копий/мл	Среднее значение порогового цикла, Ct _{ср}		Стандартное отклонение (SD)		Коэффициент вариации (CV), %	
			«МагноПрайм® ФАСТ-Р»	«АмплиПрайм РИБО-преп»	«МагноПрайм® ФАСТ-Р»	«АмплиПрайм РИБО-преп»	«МагноПрайм® ФАСТ-Р»	«АмплиПрайм РИБО-преп»
Форма выпуска 1								
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	FAM	1×10 ³	36,37	36,41	0,90	0,68	2,48	1,87
		2×10 ³	38,47	38,40	0,74	0,90	1,92	2,34
	R6G	1×10 ³	36,19	36,44	0,66	0,61	1,83	1,66
		2×10 ³	38,62	38,56	0,90	0,77	2,34	1,99
	ROX	1×10 ³	35,11	35,01	0,65	0,71	1,86	2,02
		2×10 ³	37,53	37,49	0,77	0,80	2,06	2,13
	Cy5	1×10 ³	26,87	26,67	0,30	0,29	1,11	1,08
		2×10 ³	26,83	26,81	0,26	0,26	0,95	0,97
Форма выпуска 2								
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	FAM	1×10 ³	36,38	36,51	0,56	0,60	1,53	1,64
		2×10 ³	38,76	38,45	0,74	0,87	1,91	2,26
	R6G	1×10 ³	36,23	36,32	0,58	0,49	1,61	1,34
		2×10 ³	38,62	38,43	0,78	0,80	2,01	2,09
	ROX	1×10 ³	35,13	35,30	0,78	0,73	2,22	2,05
		2×10 ³	37,68	37,46	0,70	0,82	1,85	2,20
	Cy5	1×10 ³	27,52	27,53	0,28	0,27	1,01	0,97
		2×10 ³	27,41	27,60	0,29	0,31	1,07	1,14

9.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® Грипп А Н5/Н7/Н9» были использованы 100 образцов мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки. Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора представлены в таблице 15.

В качестве набора сравнения, с помощью которого устанавливали наличие/отсутствие РНК субтипов Н5, Н7, Н9 вируса гриппа А использовался набор реагентов «АмплиСенс® Influenza virus А-тип-Н5, Н7, Н9-FL» (ПУ № РЗН 2014/1720).

Таблица 15

**Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора
«АмплиПрайм® Грипп А Н5/Н7/Н9»**

Биоматериал	Всего образцов	Число образцов с истинно положительными/отрицательными результатами	Тестируемый набор «АмплиПрайм® Грипп А Н5/Н7/Н9»		Набор сравнения «АмплиСенс® Influenza virus А-тип-Н5, Н7, Н9-FL»
			Форма выпуска 1	Форма выпуска 2	
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, содержащие РНК субтипа Н5 вируса гриппа А	100	Положительных	25	25	25
		Отрицательных	75	75	75
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, содержащие РНК субтипа Н7 вируса гриппа А		Положительных	25	25	25
		Отрицательных	75	75	75
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, содержащие РНК субтипа Н9 вируса гриппа А		Положительных	25	25	25
		Отрицательных	75	75	75

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® Грипп А Н5/Н7/Н9» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 16.

Таблица 16

**Диагностические характеристики набора реагентов
«АмплиПрайм® Грипп А Н5/Н7/Н9»**

Биоматериал	Возбудитель	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность
Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	Субтип Н5 вируса гриппа А	100 % (95,20 % - 100 %)	100 % (86,28 % – 100 %)
	Субтип Н7 вируса гриппа А	100 % (95,20 % - 100 %)	100 % (86,28 % – 100 %)
	Субтип Н9 вируса гриппа А	100 % (95,20 % - 100 %)	100 % (86,28 % – 100 %)

9.5. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом материале, на эффективность ОТ-ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® Грипп А Н5/Н7/Н9» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 17, в максимально возможной концентрации для данного вида биоматериала.

Таблица 17

**Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора
«АмплиПрайм® Грипп А Н5/Н7/Н9»**

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	гемоглобин	200 мг/мл
	муцин	2,3 мг/мл
	хлоргексидин	0,1 %
	мирамистин	0,001 %
	ксилометазолин	0,01 %

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 более 5 суток. Набор реагентов при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

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

10.3. Хранение

Набор реагентов необходимо разукomплектовать. Контрольные образцы (ПКО Грипп А 5/7/9, ВКО R, ОКО и К-) хранить при температуре от 2 до 8 °С. Остальные реагенты хранить в морозильной камере при температуре от -24 до -16 °С в течение всего срока годности набора. ПЦР-смесь Грипп А 5/7/9 хранить в защищенном от света месте. Допустимо размораживать и замораживать реагенты не более 5 раз. Необходимо минимизировать время нахождения Taq полимеразы и Ревертазы R при комнатной температуре.

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

ВНИМАНИЕ! Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси Грипп А 5/7/9 и Буфера С, входящих в состав формы выпуска 1, хранению 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® Грипп А H5/H7/H9» 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: nextbio.ru.

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Номер по каталогу



Изготовитель



Номер партии



Дата изготовления



Медицинское изделие для
диагностики *in vitro*



Использовать до



Содержимого достаточно для
проведения <n> тестов



Температурный
диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению или к
инструкции по применению в
электронном виде



Не допускать
воздействия
солнечного света



Осторожно