



Набор реагентов для выявления и дифференциации РНК вирусов гриппа А и В  
методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»  
«АмплиПрайм® Flu А/В» по ТУ 21.20.23-203-09286667-2023

## **АмплиПрайм® Flu А/В**

# **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 .....	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.....	11
6.3. Экстракция НК из исследуемых образцов.....	11
6.4. Обратная транскрипция, амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов.....	11
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ.....	12
7.1. Мазки со слизистой оболочки носоглотки.....	13
7.2. Мазки со слизистой оболочки ротоглотки.....	13
7.3. Мокрота.....	13
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	14
8.1. Экстракция НК из исследуемого материала .....	14
8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР.....	14
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.....	19
9.1. Предел обнаружения .....	19
9.2. Аналитическая специфичность.....	20
9.3. Воспроизводимость и повторяемость измерения .....	20
9.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность .....	21
9.5. Оценка влияния интерферирующих веществ .....	21
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА.....	23
10.1. Срок годности.....	23
10.2. Транспортирование .....	23
10.3. Хранение.....	23
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	23
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ .....	24

---

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

---

Сt	– 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
ОРВИ	– острая респираторная вирусная инфекция
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 вирусов гриппа А и В методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Flu А/В» по ТУ 21.20.23-203-09286667-2023

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Flu А/В», а также сокращение Набор реагентов.

---

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

---

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® Flu A/B» предназначен для выявления и дифференциации РНК вирусов гриппа А и В в биологическом материале (мазках со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокроте), 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 вирусов гриппа А и В в биологическом материале человека).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, для скрининга лиц с подозрением на инфекции респираторного тракта. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

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 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 ДНК 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 смеси для проведения ПЦР, в пробирках 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 смеси для проведения ПЦР, раскапанные под прослойку парафина по стрипованным (12,5 стрипов по 8 пробирок) пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

## Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
<b>Форма выпуска 1</b>			
<b>ПЦР-реагенты</b>			
ПЦР-смесь Flu A/B	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.
К-	0,2	1 пробирка	Отрицательный контроль ОТ-ПЦР. Прозрачная жидкость.
<b>Контроли</b>			
ПКО Flu A/B	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ВКО R	1,2	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,2	1 пробирка	Отрицательный контроль экстракции. Прозрачная жидкость.
<b>Форма выпуска 2</b>			
<b>ПЦР-смесь</b>			
ПЦР-смесь Flu A/B	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, распакана в стрипованные пробирки под парафин белого цвета.
<b>ПЦР-реагенты</b>			
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.
К-	0,2	1 пробирка	Отрицательный контроль ОТ-ПЦР. Прозрачная жидкость.
<b>Контроли</b>			
ПКО Flu A/B	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ВКО R	1,2	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,2	1 пробирка	Отрицательный контроль экстракции. 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 основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО R), последующим проведением реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемых вирусов, кДНК ВКО R с гибридационно-флуоресцентной детекцией. 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 термоллабилен 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*, кДНК *Influenza virus B* и последовательность ВКО R. Результаты амплификации регистрируются по трем различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

### Соответствие НК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G <sup>3</sup>	ROX
НК-мишень	ДНК ВКО	Вирус гриппа А ( <i>Influenza virus A</i> )	Вирус гриппа В ( <i>Influenza virus B</i> )
Область амплификации	Искусственно синтезированная последовательность	7 сегмент (matrix gene)	7 сегмент (matrix 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.

---

## **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 (К-) и положительный контроль (ПКО Flu A/B). 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 (К-) тестируется, начиная с этапа ОТ-ПЦР, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться РНК 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 РНК выявляемых вирусов, и контроля, начиная с этапа ОТ-ПЦР.

В качестве положительного контроля этапа ОТ-ПЦР используются реагенты ПКО Flu A/B, входящие 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 регламентированными 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 выявляемых вирусов.

---

## **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 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».

## 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, 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).

<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 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 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.

5.4. Отрицательные результаты не исключают возможность инфицирования выявляемыми набором вирусами и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациентов.

5.5. Отрицательные результаты должны сочетаться с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

5.6. Набор реагентов может не выявлять наличие вирусов, если их концентрация ниже заявленного предела обнаружения (500 копий/мл).

5.7. 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 слизистых оболочек (полости носа, ротоглотки) однократного применения, стерильный, изготовленный из полипропилена/полистирола с вязкой или хлопком.

6.1.3. Емкость для взятия, хранения и транспортировки мокроты, однократного применения, стерильная, с завинчивающейся или плотно защелкивающейся крышкой, изготовленная из полипропилена.

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

6.2.1. Реагент для предобработки мокроты с целью проведения экстракции РНК.

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

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

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

- набор позволяет выделять НК из биологического материала (мазки со слизистой носо- и ротоглотки, мокрота) 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).

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

## **6.4. Обратная транскрипция, амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов**

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз/РНКаз, следующих видов:

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционных смесей;
- 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.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 1000 мкл.

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

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 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.

6.4.8. 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 и ROX 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

- для приборов планшетного типа 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»: Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399), ДТпрайм (РУ № ФСР 2011/10229).

6.4.9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °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 служат:

- мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки;
- мокрота.

**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;
- 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;
- либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

### **7.3. Мокрота**

#### **7.3.1. 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.

#### **7.3.2. 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 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**<sup>7</sup> (при использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп») или **100 мкл** (при использовании наборов реагентов «МагноПрайм® ФАСТ-Р»).

### 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.

<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.

### Расчет объемов компонентов реакционных смесей

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь Flu A/B	$10,0*(N+1)$	N – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Буфер С	$5,0*(N+1)$	
Тақ полимеразы	$1,0*(N+1)$	
Ревертаза R	$0,25*(N+1)$	

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 РНК 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 Тақ 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	$10,0*(N+1)$	N – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Тақ полимеразы	$1,0*(N+1)$	
Ревертаза R	$0,25*(N+1)$	

8.2.2.2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с **Буфером D**, **Тақ полимеразой** и **Ревертазой R**, 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 Flu A/B**, 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 Flu A/B**.

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	

**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 и по другим используемым каналам, помимо указанных 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 вортесе.

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 трём каналам детекции (см. таблицу 8).

Таблица 8

**Детекция флуоресцентного сигнала**

Канал для флуороформа	FAM	R6G	ROX
Продукт амплификации	ДНК ВКО	Вирус гриппа А ( <i>Influenza virus A</i> )	Вирус гриппа В ( <i>Influenza virus B</i> )

#### 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 <b>FAM, R6G, ROX не определено или определено выше граничного</b> <sup>8</sup> .	<b>Невалидный!</b> Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора <b>R6G 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>FAM не учитывается</b> .	<b>РНК вируса гриппа А обнаружена</b>
Значение Ct по каналу для флуорофора <b>ROX 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>FAM не учитывается</b> .	<b>РНК вируса гриппа В обнаружена</b>
Значение Ct по каналам для флуорофоров <b>R6G / ROX не определено или определено выше граничного</b> , при этом значение Ct по каналу для флуорофора <b>FAM определено не выше граничного</b> .	<b>РНК вируса гриппа А / РНК вируса гриппа В не обнаружена</b>

Таблица 10

## Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
	FAM	R6G	ROX
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct определено не выше граничного <sup>8</sup>	Значение Ct отсутствует	Значение Ct отсутствует
ПКО Flu A/B	Значение Ct отсутствует	Значение Ct определено не выше граничного	Значение Ct определено не выше граничного
К- (отрицательный контроль 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 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, R6G, ROX 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 Flu A/B) по каналу для флуорофоров 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.

<sup>8</sup> 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 обнаружения<sup>9</sup>

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® Flu A/B» 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	Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	«МагноПрайм® ФАСТ-Р»	5×10 <sup>2</sup>	4,78×10 <sup>2</sup> - 9,02×10 <sup>2</sup>
	Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	«АмплиПрайм РИБО-преп»		3,79×10 <sup>2</sup> - 6,54×10 <sup>2</sup>
	Мокрота	«МагноПрайм® ФАСТ-Р»		3,79×10 <sup>2</sup> - 6,54×10 <sup>2</sup>
	Мокрота	«АмплиПрайм РИБО-преп»		3,42×10 <sup>2</sup> - 5,61×10 <sup>2</sup>
Грипп В	Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	«МагноПрайм® ФАСТ-Р»		4,08×10 <sup>2</sup> - 7,13×10 <sup>2</sup>
	Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	«АмплиПрайм РИБО-преп»		4,08×10 <sup>2</sup> - 7,13×10 <sup>2</sup>
	Мокрота	«МагноПрайм® ФАСТ-Р»		3,42×10 <sup>2</sup> - 5,61×10 <sup>2</sup>
	Мокрота	«АмплиПрайм РИБО-преп»		4,78×10 <sup>2</sup> - 9,02×10 <sup>2</sup>

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

## 9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов «АмплиПрайм® Flu A/B» обнаруживает фрагменты РНК вирусов гриппа А и В.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК микроорганизмов и вирусов (см. таблицу 12) и геномной ДНК человека. НК микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее  $1 \times 10^6$  копий/мл, и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие РНК вирусов гриппа А и В.

Дополнительно подтверждалось отсутствие перекрестных реакций между выявляемыми набором вирусами при тестировании НК вирусов в концентрации не менее  $1 \times 10^4$  копий/мл.

Таблица 12

### Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
<i>Bordetella parapertussis</i>	Human coronavirus NL63
<i>Bordetella pertussis</i>	Human respiratory syncytial virus
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Human rhinovirus
<i>Bordetella holmesii</i>	Human parainfluenza virus
<i>Haemophilus influenzae</i>	Human adenovirus
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Human metapneumovirus
<i>Staphylococcus aureus</i>	Human coronavirus 229E
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Epstein-Barr virus
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Human herpesvirus 6
<i>Legionella pneumophila</i>	Cytomegalovirus
Human coronavirus OC43	геномная ДНК человека.

При тестировании образцов НК вышеперечисленных 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 вирусов в двух концентрациях (см. таблицу 13 и 14).

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

Таблица 13

### Повторяемость измерения

Образец	Концентрация, копий/мл	Среднее значение порогового цикла, $Ct_{cp}$		Стандартное отклонение (SD)		Коэффициент вариации (CV), %	
		R6G	ROX	R6G	ROX	R6G	ROX
<b>Форма выпуска 1</b>							
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	$5 \times 10^2$	34,44	36,01	0,28	0,30	0,80	0,85
	$1 \times 10^3$	33,26	34,74	0,30	0,33	0,89	0,95
Мокрота	$5 \times 10^2$	34,50	35,99	0,27	0,31	0,78	0,87
	$1 \times 10^3$	33,29	34,81	0,41	0,33	1,24	0,94
<b>Форма выпуска 2</b>							
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	$5 \times 10^2$	36,97	38,50	0,27	0,25	0,74	0,66
	$1 \times 10^3$	35,80	37,27	0,34	0,32	0,94	0,87
Мокрота	$5 \times 10^2$	36,93	38,47	0,29	0,25	0,77	0,66
	$1 \times 10^3$	35,74	37,23	0,34	0,25	0,97	0,68

### Воспроизводимость измерения

Образец	Концентрация, копий/мл	Среднее значение порогового цикла, $C_{т\text{р}}$		Стандартное отклонение (SD)		Коэффициент вариации (CV), %	
		R6G	ROX	R6G	ROX	R6G	ROX
<b>Форма выпуска 1</b>							
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	5×10 <sup>2</sup>	34,51	35,95	0,27	0,32	0,78	0,90
	1×10 <sup>3</sup>	33,36	34,74	0,26	0,40	0,78	1,15
Мокрота	5×10 <sup>2</sup>	34,49	35,91	0,29	0,27	0,83	0,76
	1×10 <sup>3</sup>	33,34	34,64	0,37	0,36	1,10	1,03
<b>Форма выпуска 2</b>							
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	5×10 <sup>2</sup>	37,01	38,54	0,24	0,27	0,65	0,71
	1×10 <sup>3</sup>	35,73	37,29	0,31	0,32	0,87	0,85
Мокрота	5×10 <sup>2</sup>	36,93	38,50	0,28	0,30	0,77	0,77
	1×10 <sup>3</sup>	35,63	37,27	0,30	0,32	0,84	0,86

#### 9.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® Flu A/B» были использованы образцы каждого вида биоматериала, предусмотренного назначением набора реагентов, в количестве, указанном в таблице 15.

В качестве набора сравнения, с помощью которого устанавливали наличие/отсутствие ДНК Flu A/B, использовался набор реагентов «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 / Flu (A/B/H1pdm09)» (ПУ № РЗН 2020/12809).

Таблица 15

#### Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® Flu A/B»

Исследуемые образцы			Результаты тестирования		
Тип	Вирус	Количество	Образцы	Тестируемый набор «АмплиПрайм® Flu A/B»	Набор сравнения «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 / Flu (A/B/H1pdm09)»
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	Грипп А	630	Положительных	130	130
			Отрицательных	500	500
	Грипп В	630	Положительных	130	130
			Отрицательных	500	500
Мокрота	Грипп А	630	Положительных	130	130
			Отрицательных	500	500
	Грипп В	630	Положительных	130	130
			Отрицательных	500	500

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® Flu A/B» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 16.

Таблица 16

#### Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® Flu A/B»

Тип образцов	Вирус	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность	Количество образцов
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	Грипп А	100 % (97,0 % – 100 %)	100 % (99,3 % – 100 %)	630
	Грипп В	100 % (97,0 % – 100 %)	100 % (99,3 % – 100 %)	630
Мокрота	Грипп А	100 % (97,0 % – 100 %)	100 % (99,3 % – 100 %)	630
	Грипп В	100 % (97,0 % – 100 %)	100 % (99,3 % – 100 %)	630

## 9.5. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом материале, на эффективность ОТ-ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® Flu A/B» 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.

Отсутствие влияния интерферирующих веществ для образцов мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки (муцин, гемоглобин, антисептик «Мирамистин», антисептик «Хлоргексидин», «Галазолин®») и мокроты (муцин, гемоглобин, антисептик «Мирамистин», антисептик «Хлоргексидин») было показано в испытаниях с использованием набора для экстракции «МагноПрайм® ФАСТ-Р» (РУ № РЗН 2020/12971).

Таблица 17

**Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора «АмплиПрайм® Flu A/B»**

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 %
	ксилотетразолин	0,01 %
Мокрота	гемоглобин	200 мг/мл
	муцин	2,3 мг/мл
	хлоргексидин	0,1 %
	мирамистин	0,001 %

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 разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

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

### 10.3. Хранение

Набор реагентов необходимо разуккомплектовать. Контрольные образцы (ПКО Flu A/B, ВКО R и ОКО) 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 Flu A/B 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. Реакционные смеси, приготовленные из реагентов, хранению не подлежат.

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® Flu A/B» 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		