АмплиПрайм

IVD

Набор реагентов для выявления РНК вирусов парагриппа 1-4 типов, риновирусов человека, ортопневмовируса человека, коронавирусов человека 229E, HKU1, NL63, OC43, метапневмовируса человека и ДНК аденовирусов и бокавирусов человека методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс» по ТУ 21.20.23-141-09286667-2021

АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс

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

НекстБИО
Биотехнологическая компания

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.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 7
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 12
6.1.Взятие исследуемого материала 12
6.2.Экстракция НК из исследуемых образцов 12
6.3.Обратная транскрипция, амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов 12
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ 14
7.1.Мазки из полости носа 14
7.2.Мазки со слизистой оболочки ротоглотки 14
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ 15
8.1.Экстракция НК из исследуемого материала 15
8.2.Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР 15
8.3.Внесение проб НК, проведение ОТ-ПЦР и детекции 17
8.4.Анализ и вычисление результатов 18
8.5.Интерпретация результатов 19
8.6.Возможные ошибки и рекомендации по их решению 21
8.7.Диагностическое значение полученного результата 21
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА 22
9.1.Предел обнаружения 22
9.2.Аналитическая специфичность 23
9.3.Воспроизводимость и повторяемость измерения 23
9.4.Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность 26
9.5.Оценка влияния интерферирующих веществ 27
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА 29
10.1. Срок годности 29
10.2. Транспортирование 29
10.3. Хранение 29
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 29
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 30

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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
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 РНК вирусов парагриппа 1-4 типов, риновирусов человека, ортопневмовируса человека, коронавирусов человека 229E, HKU1, NL63, OC43, метапневмовируса человека и ДНК аденовирусов и бокавирусов человека методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс» по ТУ 21.20.23-141-09286667-2021.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс», а также сокращение Набор реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс» предназначен для выявления РНК вирусов парагриппа 1-4 типов, риновирусов человека, ортопневмовируса человека, коронавирусов человека 229E, HKU1, NL63, OC43, метапневмовируса человека и ДНК аденовирусов и бокавирусов человека в биологическом материале (мазки со слизистой 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 НК, 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 РНК вирусов парагриппа 1-4 типов, риновирусов человека, ортопневмовируса человека, коронавирусов человека 229E, HKU1, NL63, OC43, метапневмовируса человека и ДНК аденовирусов и бокавирусов человека методом ОТ-ПЦР в биологическом материале человека).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для скринингового исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на инфекции респираторного тракта и для мониторинга терапии ОРВИ. 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 трёх формах (состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно). Все три 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, раскапанные под прослойку парафина по 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Форма выпуска 2 включает смеси для проведения ПЦР в пробирках объемом 1,5 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 3 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 типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
ПЦР-смеси			
ПЦР-смесь ОРВИ-1	0,01	100 пробирок	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. **Прозрачная жидкость**, раскапана под **парафин белого цвета**.
ПЦР-смесь ОРВИ-2	0,01	100 пробирок	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. **Розовая жидкость**, раскапана под **парафин белого цвета**.
ПЦР-смесь ОРВИ-3	0,01	100 пробирок	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. **Прозрачная жидкость**, раскапана под **парафин синего цвета**.
ПЦР-реагенты			
Буфер D	1,2	3 пробирки	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.
Taq полимераза	0,12	3 пробирки	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза R	0,03	3 пробирки	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
К-	0,30	1 пробирка	Отрицательный контроль ОТ-ПЦР. Прозрачная жидкость.
Контроли			
ПКО ОРВИ	0,4	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.
Форма выпуска 2			
ПЦР-смеси			
ПЦР-смесь ОРВИ-1	1,2	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. **Прозрачная жидкость**.
ПЦР-смесь ОРВИ-2	1,2	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. **Розовая жидкость**.
ПЦР-смесь ОРВИ-3	1,2	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. **Прозрачная жидкость**.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
ПЦР-реагенты			
Буфер C	0,65	3 пробирки	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.
Taq полимераза	0,12	3 пробирки	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза R	0,03	3 пробирки	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
К-	0,30	1 пробирка	Отрицательный контроль ОТ-ПЦР. Прозрачная жидкость.
Контроли			
ПКО ОРВИ	0,4	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.
Форма выпуска 3			
ПЦР-смеси			
ПЦР-смесь ОРВИ-1	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. **Прозрачная жидкость**, раскапана в стрипованные пробирки под **парафин белого цвета**.
ПЦР-смесь ОРВИ-2	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. **Розовая жидкость**, раскапана в стрипованные пробирки под **парафин белого цвета**.
ПЦР-смесь ОРВИ-3	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. **Прозрачная жидкость**, раскапана в стрипованные пробирки под **парафин синего цвета**.
ПЦР-реагенты			
Буфер D	1,2	3 пробирки	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.
Taq полимераза	0,12	3 пробирки	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза R	0,03	3 пробирки	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
К-	0,30	1 пробирка	Отрицательный контроль ОТ-ПЦР. Прозрачная жидкость.
Контроли			
ПКО ОРВИ	0,4	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.

[1] Пустые пробирки не используются.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1, 2 или 3)	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде[2] на официальном сайте Производителя: www.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: www.nextbio.ru	-

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на проведении обратной транскрипции (синтезе молекулы кДНК по молекуле РНК с использованием фермента ревертазы) и последующей амплификации кДНК и ДНК выявляемых вирусов и внутреннего контрольного образца (ВКО) при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционных смесей флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

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

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

Каждый исследуемый образец тестируется в 3-х пробирках, в которых в ходе ОТ-ПЦР одновременно амплифицируются фрагменты геномов вирусов парагриппа 1-4 типов, риновирусов человека, ортопневмовируса человека, коронавирусов человека 229E, HKU1, NL63, OC43, метапневмовируса человека, аденовирусов и бокавирусов человека, и последовательность ВКО R. Результаты амплификации регистрируются по пяти различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

[2] Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 3

Соответствие НК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

ПЦР-смесь	Канал для флуорофора				
	FAM	R6G[3]	ROX	Cy5	Cy5.5
	НК-мишень (область амплификации)				
ПЦР-смесь ОРВИ-1	РНК вируса парагриппа 1 и 3 типа (HN gene)	РНК вируса парагриппа 2 и 4 типа (HN gene / N gene)	РНК риновирусов человека (IRES)	ВКО R (Искусственно синтезированная последовательность)	РНК ортопневмо-вируса человека (N gene)
ПЦР-смесь ОРВИ-2	РНК коронавируса 229E (N gene)	РНК коронавируса HKU1 (RdRp gene)	РНК коронавируса NL63 (N gene)	ВКО R (Искусственно синтезированная последовательность)	РНК коронавируса OC43 (N gene)
ПЦР-смесь ОРВИ-3	ДНК аденовирусов человека (Hexon gene)	РНК метапневмовируса человека (F gene)	ДНК бокавирусов человека (Left UTR)	ВКО R (Искусственно синтезированная последовательность)	-

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 ОРВИ). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

В качестве отрицательного контроля 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.

В качестве положительного и отрицательного контроля этапа ОТ-ПЦР используются реагенты ПКО ОРВИ и К-, 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. В случае несоответствия результата для отрицательного 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 ОТ-ПЦР.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.1.2. Контроль ингибирования

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции НК, 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 контролей качества лабораторных исследований по обнаружению НК 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 НК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – ВКО R, входящим в состав набора. Без использования ВКО R невозможно провести оценку валидности постановки.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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. Перед началом работ следует ознакомиться с Методическими указаниями МУ 1.3.1877-04 «Порядок сбора, упаковки, хранения, транспортирования и проведения лабораторного анализа биологического материала от больных (и умерших) пациентов с подозрением на тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС)», утвержденными Роспотребнадзором.

5.2. 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». В соответствии с СанПиН 3.3686-21 диагностика возбудителей инфекционных болезней II группы патогенности молекулярно-генетическими методами (без накопления возбудителя) может проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с ПБА III-IV группы патогенности в соответствии с требованиями санитарных правил 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».

5.3. 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку[4], биологический материал[5], 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 клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21).

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

- 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.

5.4. 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.

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

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

[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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5.7. Набор реагентов не выявляет наличие вирусов, если их концентрация ниже заявленного предела обнаружения ($1x10^3$ копий/мл).

5.8. 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 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 вискозой 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 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 ЮНИ» (РУ № РЗН 2019/8955), «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 ДНКаз/РНКаз, следующих видов (при работе с формой выпуска 2):

- 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;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- 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 ДНКаз/РНКаз, 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 2 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, Cy5 и Cy5.5 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
Cy5.5	660	690	705	750

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100°С;
- точность поддержания температуры ≤ ±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), Applied Biosystems QuantStudio 5 (РУ № РЗН 2019/8446), C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399).

6.3.9. Холодильник 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат мазки со слизистой носо- и ротоглотки.

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

Взятие, 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 из полости носа

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории[6]:

- 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» или «МагноПрайм ЮНИ»).

8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР

8.2.1. При использовании формы выпуска 1 и 3

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

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

8.2.1.1. Рассчитать объемы реагентов, требующиеся для приготовления 3-х реакционных смесей (см. таблицу 5). Каждую смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

[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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 5

Расчет объемов компонентов реакционных смесей

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
Буфер D	**10,0***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Taq полимераза	**1,0***(N+1)	
Ревертаза R	**0,25***(N+1)	

8.2.1.2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с **Буфером D**, **Taq полимеразой** и **Ревертазой R**, осадить капли на вортексе.

8.2.1.3. Приготовить реакционные смеси в 3-х отдельных пробирках, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1.1. Перемешать смеси и осадить капли на вортексе.

8.2.1.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов с **ПЦР-смесью ОРВИ-1**, **ПЦР-смесью ОРВИ-2**, **ПЦР-смесью ОРВИ-3** для проведения ОТ-ПЦР НК исследуемых и контрольных образцов.

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

8.2.1.6. На поверхность парафина внести по **10 мкл** приготовленных **реакционных смесей**, при этом они не должны проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесями.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционных смесей хранению не подлежат.

8.2.2. При использовании формы выпуска 2

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

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

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционных смесей с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.2.1. Рассчитать объемы реагентов, требующиеся для приготовления 3-х реакционных смесей (см. таблицу 6). Каждую 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
ПЦР-смесь ОРВИ-1 / ПЦР-смесь ОРВИ-2 / ПЦР-смесь ОРВИ-3	**10,0***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Буфер C	**5,0***(N+1)	
Taq полимераза	**1,0***(N+1)	
Ревертаза R	**0,25***(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 реакционные смеси в 3-х отдельных пробирках, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.2.1. Перемешать смеси и осадить капли на вортексе.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.2.2.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения ОТ-ПЦР НК исследуемых и контрольных образцов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.2.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленных реакционных смесей.

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! Каждый исследуемый и контрольный образец вносить в 3 реакционные смеси (ПЦР-смесь ОРВИ-1, ПЦР-смесь ОРВИ-2, ПЦР-смесь ОРВИ-3) согласно схеме на рисунке 1. Контрольные образцы вносить после исследуемых.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционными смесями по **10 мкл проб НК**, полученных в результате экстракции. Выделенная НК из образца от одного пациента вносится в 3 пробирки с каждой ПЦР-смесью ОРВИ.

8.3.2. Внести в подготовленные пробирки с реакционными смесями контрольные образцы:

а) положительный контроль ОТ-ПЦР – в 3 пробирки с каждой **ПЦР-смесью ОРВИ** для образцов **ПКО** внести по **10 мкл ПКО ОРВИ**.

б) отрицательный контроль экстракции – в 3 пробирки с каждой **ПЦР-смесью ОРВИ** для образцов **ОКО** внести по **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

в) отрицательный контроль ОТ-ПЦР – в 3 пробирки с каждой **ПЦР-смесью ОРВИ** для образцов **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).

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.

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, Cy5.5	

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Примечание - Для удобного анализа получаемых результатов рекомендуется расположить стрипы или пробирки с ПЦР-смесями в амплификатор планшетного типа в соответствии со схемой на рисунке 1: стрип/8 пробирок с ПЦР-смесью ОРВИ-1 (белый) расположить в первом вертикальном ряду планшета, стрип/8 пробирок с ПЦР-смесью ОРВИ-2 (розовый) – во втором ряду, стрип/8 пробирок с ПЦР-смесью ОРВИ-3 (голубой) – в третьем. В четвертом вертикальном ряду снова поставить стрип/8 пробирок с ПЦР-смесью ОРВИ-1 и т.д.

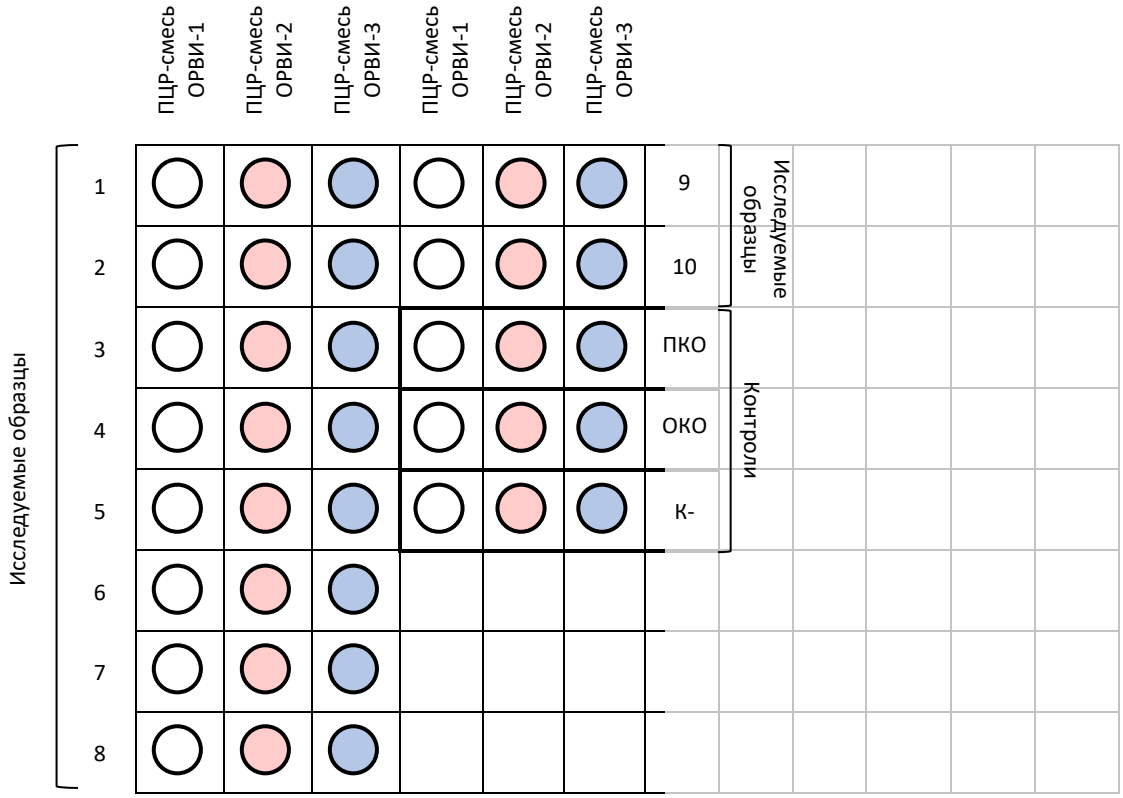


Рисунок 1 – Схема расстановки пробирок с ПЦР-смесями для 10-ти исследуемых образцов в амплификатор планшетного типа

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 пяти каналам детекции (см. таблицу 8).

Таблица 8

Детекция флуоресцентного сигнала

ПЦР-смесь	**Канал для флуорофора**				
	FAM	**R6G**	**ROX**	**Cy5**	**Cy5.5**
	Продукт амплификации				
ПЦР-смесь ОРВИ-1	РНК вируса парагриппа 1 и 3 типа	РНК вируса парагриппа 2 и 4 типа	РНК риновирусов человека	ВКО R	РНК ортопневмо-вируса человека
ПЦР-смесь ОРВИ-2	РНК коронавируса 229E	РНК коронавируса HKU1	РНК коронавируса NL63	ВКО R	РНК коронавируса OC43
ПЦР-смесь ОРВИ-3	ДНК аденовирусов человека	РНК метапневмо-вируса человека	ДНК бокавирусов человека	ВКО R	-

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 9

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM, R6G, ROX, Cy5.5 не определено или определено выше граничного** и по каналу для флуорофора **Cy5 не определено или определено выше граничного**[8] для ПЦР-смесей ОРВИ-1, ОРВИ-2 или ОРВИ-3	**Для соответствующей ПЦР-смеси результат Невалидный!** Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM** и/или **R6G** и/или **ROX** и/или **Cy5.5 для ПЦР-смеси ОРВИ-1 определено не выше граничного**. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.	**РНК вируса парагриппа 1 или 3 типа** и/или **РНК вируса парагриппа 2 или 4 типа** и/или **РНК риновирусов человека** и/или **РНК ортопневмовируса человека обнаружена** соответственно
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM** и/или **R6G** и/или **ROX** и/или **Cy5.5 для ПЦР-смеси ОРВИ-2 определено не выше граничного**. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.	**РНК коронавируса 229E** и/или **РНК коронавируса HKU1** и/или **РНК коронавируса NL63** и/или **РНК коронавируса OC43 обнаружена** соответственно
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM** и/или **R6G** и/или **ROX для ПЦР-смеси ОРВИ-3 определено не выше граничного**. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.	**ДНК аденовирусов** и/или **РНК метапневмовируса** и/или **ДНК бокавирусов обнаружена** соответственно
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM, R6G, ROX, Cy5.5 не определено** или **определено выше граничного,** при этом для соответствующей ПЦР-смеси значение Ct по каналу для флуорофора **Cy5 определено не выше граничного**.	**ДНК/РНК соответствующих выявляемых возбудителей не обнаружена**

Таблица 10

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора				
	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует для всех 3-х ПЦР-смесей			Значение Ct определено не выше граничного[8] для всех 3-х ПЦР-смесей	Значение Ct отсутствует для ПЦР-смеси ОРВИ-1 и ПЦР-смеси ОРВИ-2
ПКО ОРВИ	Значение Ct определено не выше граничного для всех 3-х ПЦР-смесей			Значение Ct отсутствует для всех 3-х ПЦР-смесей	Значение Ct определено не выше граничного для ПЦР-смеси ОРВИ-1 и ПЦР-смеси ОРВИ-2
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует для всех 3-х ПЦР-смесей				Значение Ct отсутствует для ПЦР-смеси ОРВИ-1 и ПЦР-смеси ОРВИ-2

Примечания:

1) Значение Ct по каналу Cy5.5 для ПЦР-смеси ОРВИ-3 не учитывается.

2) Контрольные образцы в каждой ПЦР-смеси оцениваются отдельно. В случае сбоя прохождения контроля для одной из ПЦР-смесей необходимо повторить анализ образцов только для этой ПЦР-смеси.

[8] Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению

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

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

8.6.3. Для положительного контрольного образца (ПКО) по каналу для флуорофоров FAM, R6G, ROX или Cy5.5 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.

8.6.5. 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения[9]

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс» 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
Вирус парагриппа 1 типа	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	АмплиПрайм РИБО-преп	1×10^3	$0{,}873\times10^3$ – $1{,}53\times10^3$
		МагноПрайм ЮНИ		$0{,}890\times10^3$ – $1{,}57\times10^3$
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		$0{,}896\times10^3$ – $1{,}55\times10^3$
Вирус парагриппа 2 типа		АмплиПрайм РИБО-преп		$0{,}867\times10^3$ – $1{,}42\times10^3$
		МагноПрайм ЮНИ		$0{,}799\times10^3$ – $1{,}28\times10^3$
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		$0{,}913\times10^3$ – $1{,}52\times10^3$
Вирус парагриппа 3 типа		АмплиПрайм РИБО-преп		$0{,}865\times10^3$ – $1{,}39\times10^3$
		МагноПрайм ЮНИ		$0{,}835\times10^3$ – $1{,}38\times10^3$
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		$0{,}794\times10^3$ – $1{,}29\times10^3$
Вирус парагриппа 4 типа		АмплиПрайм РИБО-преп		$0{,}824\times10^3$ – $1{,}44\times10^3$
		МагноПрайм ЮНИ		$0{,}776\times10^3$ – $1{,}33\times10^3$
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		$0{,}788\times10^3$ – $1{,}37\times10^3$
Риновирусы человека		АмплиПрайм РИБО-преп		$0{,}824\times10^3$ – $1{,}49\times10^3$
		МагноПрайм ЮНИ		$0{,}883\times10^3$ – $1{,}64\times10^3$
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		$0{,}850\times10^3$ – $1{,}59\times10^3$
Ортопневмовирус человека		АмплиПрайм РИБО-преп		$0{,}772\times10^3$ – $1{,}44\times10^3$
		МагноПрайм ЮНИ		$0{,}901\times10^3$ – $1{,}78\times10^3$
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		$0{,}786\times10^3$ – $1{,}50\times10^3$
Коронавирус 229E		АмплиПрайм РИБО-преп		$0{,}824\times10^3$ – $1{,}65\times10^3$
		МагноПрайм ЮНИ		$0{,}761\times10^3$ – $1{,}48\times10^3$
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		$0{,}785\times10^3$ – $1{,}59\times10^3$
Коронавирус HKU1		АмплиПрайм РИБО-преп		$0{,}696\times10^3$ – $1{,}48\times10^3$
		МагноПрайм ЮНИ		$0{,}709\times10^3$ – $1{,}55\times10^3$
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		$0{,}666\times10^3$ – $1{,}48\times10^3$
Коронавирус NL63		АмплиПрайм РИБО-преп		$0{,}826\times10^3$ – $1{,}31\times10^3$
		МагноПрайм ЮНИ		$0{,}798\times10^3$ – $1{,}24\times10^3$
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		$0{,}833\times10^3$ – $1{,}31\times10^3$
Коронавирус OC43		АмплиПрайм РИБО-преп		$0{,}882\times10^3$ – $1{,}40\times10^3$
		МагноПрайм ЮНИ		$0{,}819\times10^3$ – $1{,}28\times10^3$
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		$0{,}883\times10^3$ – $1{,}38\times10^3$
Аденовирусы человека		АмплиПрайм РИБО-преп		$0{,}923\times10^3$ – $1{,}44\times10^3$
		МагноПрайм ЮНИ		$0{,}897\times10^3$ – $1{,}38\times10^3$
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		$0{,}959\times10^3$ – $1{,}51\times10^3$
Метапневмовирус человека		АмплиПрайм РИБО-преп		$0{,}865\times10^3$ – $1{,}34\times10^3$
		МагноПрайм ЮНИ		$0{,}831\times10^3$ – $1{,}27\times10^3$
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		$0{,}887\times10^3$ – $1{,}37\times10^3$
Бокавирусы человека		АмплиПрайм РИБО-преп		$0{,}594\times10^3$ – $1{,}81\times10^3$
		МагноПрайм ЮНИ		$0{,}739\times10^3$ – $2{,}09\times10^3$
		МагноПрайм® ФАСТ-Р		$0{,}762\times10^3$ – $2{,}30\times10^3$

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс» обнаруживает фрагменты РНК вирусов парагриппа 1-4 типов, риновирусов человека, ортопневмовируса человека, коронавирусов человека 229E, HKU1, NL63, OC43, метапневмовируса человека и ДНК аденовирусов и бокавирусов человека.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК микроорганизмов и вирусов (см. таблицу 12), SARS-CoV-2, Flu, RSV Positive Run Control и геномной ДНК человека. НК микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее $1x10^6$ копий/мл, SARS-CoV-2, Flu, RSV Positive Run Control в концентрации $1x10^4$ копий/мл и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие выявляемые набором мишени.

Дополнительно подтверждалось отсутствие перекрестных реакций между выявляемыми набором вирусами при тестировании НК вирусов в концентрации не менее $1x10^6$ копий/мл.

Таблица 12

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
Bordetella parapertussis	*Mycoplasma pneumoniae*
Bordetella pertussis	Вирус гриппа A (H5N1) (штамм A/NIBGR-14)
Bordetella bronchiseptica	Вирус гриппа A (H3N2) штамм A/Камбоджа/e0826360/20
Haemophilus influenza	Вирус гриппа A (H0N1) (штамм A/Киев/3304/84)
Klebsiella pneumoniae	Вирус гриппа A (H2N2) (штамм A/Ленинград/549/80)
Staphylococcus aureus	Вирус гриппа A (H7N9) (штамм A/Шанхай/2/2013)
Streptococcus pneumoniae	Вирус гриппа B (штамм B/Пхукет/3073/13)
Legionella pneumophila	Вирус гриппа B штамм B/Вашингтон/02/19
Pseudomonas aeruginosa	-

При тестировании образцов НК вышеперечисленных микроорганизмов и вирусов, SARS-CoV-2, Flu, RSV Positive Run Control 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 ТЕ-буфере с poly(A). Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию НК, ОТ-ПЦР и детекцию результатов).

Таблица 13

Повторяемость измерения

Вирус	**Концентрация, копий/мл**	**Среднее значение порогового цикла, $Ct_{ср}$**	**Стандартное отклонение (SD)**	**Коэффициент вариации (CV), %**
Форма выпуска 1				
Вирус парагриппа 1 типа	$1x10^3$	39,65	1,53	3,87
	$2x10^3$	35,26	1,08	3,06
Вирус парагриппа 2 типа	$1x10^3$	40,78	1,40	3,43
	$2x10^3$	37,86	0,98	2,59
Вирус парагриппа 3 типа	$1x10^3$	38,75	1,29	3,34
	$2x10^3$	35,90	1,10	3,07
Вирус парагриппа 4 типа	$1x10^3$	38,04	1,23	3,24
	$2x10^3$	35,43	0,99	2,80

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Вирус	Концентрация, копий/мл	Среднее значение порогового цикла, $Ct_{ср}$	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
Риновирусы человека	$1x10^3$	38,92	1,18	3,02
	$2x10^3$	34,17	0,85	2,49
Ортопневмовирус человека	$1x10^3$	38,72	1,17	3,03
	$2x10^3$	34,30	0,94	2,74
Коронавирус 229E	$1x10^3$	39,11	1,22	3,11
	$2x10^3$	35,68	0,96	2,70
Коронавирус HKU1	$1x10^3$	39,12	1,29	3,30
	$2x10^3$	35,88	1,03	2,88
Коронавирус NL63	$1x10^3$	37,30	1,32	3,53
	$2x10^3$	34,19	1,04	3,03
Коронавирус OC43	$1x10^3$	37,20	1,23	3,31
	$2x10^3$	34,15	0,91	2,68
Аденовирусы человека	$1x10^3$	38,17	1,23	3,23
	$2x10^3$	35,34	0,82	2,32
Метапневмовирус человека	$1x10^3$	37,20	1,37	3,68
	$2x10^3$	34,06	0,89	2,62
Бокавирусы человека	$1x10^3$	38,27	1,24	3,25
	$2x10^3$	35,08	1,02	2,91
Форма выпуска 2				
Вирус парагриппа 1 типа	$1x10^3$	37,86	1,28	3,39
	$2x10^3$	33,73	1,09	3,23
Вирус парагриппа 2 типа	$1x10^3$	39,93	1,32	3,31
	$2x10^3$	37,05	1,01	2,74
Вирус парагриппа 3 типа	$1x10^3$	37,72	1,19	3,14
	$2x10^3$	35,09	0,99	2,83
Вирус парагриппа 4 типа	$1x10^3$	36,99	1,21	3,26
	$2x10^3$	34,61	1,05	3,03
Риновирусы человека	$1x10^3$	37,87	1,37	3,62
	$2x10^3$	34,52	1,15	3,35
Ортопневмовирус человека	$1x10^3$	37,96	1,42	3,75
	$2x10^3$	34,49	1,17	3,40
Коронавирус 229E	$1x10^3$	38,26	1,25	3,27
	$2x10^3$	34,93	1,04	2,98
Коронавирус HKU1	$1x10^3$	38,20	1,21	3,17
	$2x10^3$	34,76	1,05	3,02
Коронавирус NL63	$1x10^3$	36,21	1,20	3,31
	$2x10^3$	33,31	0,96	2,88
Коронавирус OC43	$1x10^3$	36,18	1,20	3,31
	$2x10^3$	33,15	0,91	2,76
Аденовирусы человека	$1x10^3$	37,26	1,42	3,81
	$2x10^3$	34,59	0,84	2,43
Метапневмовирус человека	$1x10^3$	36,31	1,31	3,62
	$2x10^3$	33,18	0,97	2,91
Бокавирусы человека	$1x10^3$	37,28	1,32	3,54
	$2x10^3$	34,20	0,99	2,90
Форма выпуска 3				
Вирус парагриппа 1 типа	$1x10^3$	38,72	1,28	3,30
	$2x10^3$	35,51	1,08	3,04
Вирус парагриппа 2 типа	$1x10^3$	40,73	1,43	3,50
	$2x10^3$	38,16	1,22	3,20
Вирус парагриппа 3 типа	$1x10^3$	38,73	1,21	3,14
	$2x10^3$	35,53	1,02	2,88
Вирус парагриппа 4 типа	$1x10^3$	38,15	1,33	3,48
	$2x10^3$	34,76	1,11	3,20
Риновирусы человека	$1x10^3$	38,63	1,19	3,09
	$2x10^3$	35,40	0,99	2,79
Ортопневмовирус человека	$1x10^3$	38,61	1,21	3,14
	$2x10^3$	35,75	1,08	3,03
Коронавирус 229E	$1x10^3$	39,02	1,20	3,07
	$2x10^3$	35,67	1,04	2,91

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Вирус	Концентрация, копий/мл	Среднее значение порогового цикла, $Ct_{ср}$	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
Коронавирус HKU1	$1x10^3$	38,97	1,18	3,02
	$2x10^3$	35,39	0,95	2,69
Коронавирус NL63	$1x10^3$	37,42	1,35	3,62
	$2x10^3$	34,09	0,98	2,89
Коронавирус OC43	$1x10^3$	37,31	1,27	3,40
	$2x10^3$	34,32	1,04	3,04
Аденовирусы человека	$1x10^3$	38,19	1,21	3,16
	$2x10^3$	35,29	0,90	2,55
Метапневмовирус человека	$1x10^3$	37,31	1,31	3,52
	$2x10^3$	34,06	1,02	3,00
Бокавирусы человека	$1x10^3$	38,27	1,20	3,15
	$2x10^3$	35,16	0,94	2,67

Таблица 14

Воспроизводимость измерения

Вирус	Концентрация, копий/мл	Среднее значение порогового цикла, $Ct_{ср}$	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
Форма выпуска 1				
Вирус парагриппа 1 типа	$1x10^3$	39,34	2,32	5,89
	$2x10^3$	35,38	1,52	4,29
Вирус парагриппа 2 типа	$1x10^3$	40,11	1,75	4,37
	$2x10^3$	38,16	1,33	3,49
Вирус парагриппа 3 типа	$1x10^3$	39,07	1,65	4,21
	$2x10^3$	35,60	1,44	4,03
Вирус парагриппа 4 типа	$1x10^3$	38,73	1,62	4,19
	$2x10^3$	34,94	1,38	3,94
Риновирусы человека	$1x10^3$	39,21	1,58	4,03
	$2x10^3$	34,90	1,38	3,95
Ортопневмовирус человека	$1x10^3$	39,11	1,74	4,44
	$2x10^3$	34,83	1,44	4,14
Коронавирус 229E	$1x10^3$	39,27	1,62	4,13
	$2x10^3$	36,14	1,35	3,72
Коронавирус HKU1	$1x10^3$	39,34	1,60	4,06
	$2x10^3$	36,05	1,32	3,66
Коронавирус NL63	$1x10^3$	37,48	1,56	4,16
	$2x10^3$	33,89	1,34	3,95
Коронавирус OC43	$1x10^3$	37,33	1,60	4,29
	$2x10^3$	34,17	1,33	3,88
Аденовирусы человека	$1x10^3$	38,46	1,58	4,11
	$2x10^3$	35,19	1,26	3,58
Метапневмовирус человека	$1x10^3$	37,46	1,75	4,67
	$2x10^3$	34,12	1,26	3,70
Бокавирусы человека	$1x10^3$	38,27	1,57	4,09
	$2x10^3$	34,97	1,35	3,86
Форма выпуска 2				
Вирус парагриппа 1 типа	$1x10^3$	38,08	1,72	4,51
	$2x10^3$	34,19	1,40	4,09
Вирус парагриппа 2 типа	$1x10^3$	39,19	1,69	4,32
	$2x10^3$	37,08	1,34	3,61
Вирус парагриппа 3 типа	$1x10^3$	38,03	1,59	4,19
	$2x10^3$	34,85	1,39	4,00
Вирус парагриппа 4 типа	$1x10^3$	37,39	1,66	4,43
	$2x10^3$	34,25	1,24	3,62
Риновирусы человека	$1x10^3$	38,11	1,64	4,29
	$2x10^3$	34,40	1,40	4,08
Ортопневмовирус человека	$1x10^3$	38,28	1,78	4,64
	$2x10^3$	34,27	1,48	4,32
Коронавирус 229E	$1x10^3$	38,40	1,61	4,18
	$2x10^3$	35,20	1,34	3,81
Коронавирус HKU1	$1x10^3$	38,43	1,65	4,28
	$2x10^3$	34,98	1,33	3,80

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Вирус	Концентрация, копий/мл	Среднее значение порогового цикла, $Ct_{ср}$	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
Коронавирус NL63	$1x10^3$	36,70	1,88	5,13
	$2x10^3$	32,89	1,34	4,07
Коронавирус OC43	$1x10^3$	36,53	1,69	4,63
	$2x10^3$	33,17	1,33	4,00
Аденовирусы человека	$1x10^3$	37,52	1,67	4,46
	$2x10^3$	34,19	1,26	3,69
Метапневмовирус человека	$1x10^3$	36,54	1,84	5,02
	$2x10^3$	33,12	1,26	3,81
Бокавирусы человека	$1x10^3$	37,53	1,56	4,17
	$2x10^3$	34,09	1,34	3,92
Форма выпуска 3				
Вирус парагриппа 1 типа	$1x10^3$	38,64	1,61	4,17
	$2x10^3$	35,66	1,34	3,75
Вирус парагриппа 2 типа	$1x10^3$	39,96	1,74	4,36
	$2x10^3$	38,41	1,56	4,07
Вирус парагриппа 3 типа	$1x10^3$	39,13	1,60	4,08
	$2x10^3$	35,32	1,31	3,70
Вирус парагриппа 4 типа	$1x10^3$	38,28	1,70	4,45
	$2x10^3$	34,71	1,43	4,13
Риновирусы человека	$1x10^3$	39,29	1,61	4,11
	$2x10^3$	35,81	1,21	3,39
Ортопневмовирус человека	$1x10^3$	38,89	1,72	4,42
	$2x10^3$	35,49	1,34	3,78
Коронавирус 229E	$1x10^3$	39,16	1,58	4,04
	$2x10^3$	35,93	1,35	3,77
Коронавирус HKU1	$1x10^3$	39,27	1,61	4,10
	$2x10^3$	35,85	1,38	3,86
Коронавирус NL63	$1x10^3$	37,62	1,87	4,96
	$2x10^3$	34,09	1,32	3,87
Коронавирус OC43	$1x10^3$	37,47	1,52	4,06
	$2x10^3$	34,24	1,33	3,87
Аденовирусы человека	$1x10^3$	38,21	1,55	4,05
	$2x10^3$	34,92	1,32	3,77
Метапневмовирус человека	$1x10^3$	37,43	1,66	4,43
	$2x10^3$	34,30	1,26	3,67
Бокавирусы человека	$1x10^3$	38,75	1,62	4,18
	$2x10^3$	35,24	1,26	3,59

9.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс» были использованы 705 образцов мазков со слизистой носо- и ротоглотки.

В качестве наборов сравнения, с помощью которых устанавливали наличие или отсутствие НК выявляемых вирусов использовались наборы реагентов «ОРЗ ВирусКомплекс» (РУ № ФСР 2011/12016) и «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (РУ № ФСР 2011/11258).

В связи с тем, что набор реагентов «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» не позволяет дифференцировать возбудителей коронавируса 229E/NL63 и HKU1/OC43, те образцы, в которых были выявлены коронавирусы человека, были протестированы с использованием набора реагентов сравнения «ОРЗ ВирусКомплекс» для подтверждения типирования коронавирусов.

Результаты тестирования набора «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс» в сравнении с наборами сравнения приведены в таблице 15.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 15

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс»

Исследуемые образцы		Результаты тестирования			
Тип	Количество	Образцы	АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс	Наборы сравнения	
				АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL	ОРЗ ВирусКомплекс
Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	705	Положительных	390	390	104
		Отрицательных	315	315	Тестирование не проводилось

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблицах 16-17.

Таблица 16

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс» для биологического материала

Вид биоматериала	Диагностическая специфичность, %	Диагностическая чувствительность, %
Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	100 % (98,84 % – 100 %)	100 % (99,05 % – 100 %)

Таблица 17

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс» для выявляемых возбудителей

Возбудитель	Диагностическая специфичность, %	Диагностическая чувствительность, %
Вирус парагриппа 1/3 типа	100 % (99,45 % – 100 %)	100 % (91,40 % – 100 %)
Вирус парагриппа 2/4 типа	100 % (99,45 % – 100 %)	100 % (90,97 % – 100 %)
Риновирусы человека	100 % (99,43 % – 100 %)	100 % (94,04 % – 100 %)
Ортопневмовирус человека	100 % (99,43 % – 100 %)	100 % (94,04 % – 100 %)
Коронавирус 229E	100 % (99,46 % – 100 %)	100 % (87,23 % – 100 %)
Коронавирус NL63	100 % (99,46 % – 100 %)	100 % (86,28 % – 100 %)
Коронавирус HKU1	100 % (99,46 % – 100 %)	100 % (86,77 % – 100 %)
Коронавирус OC43	100 % (99,46 % – 100 %)	100 % (86,77 % – 100 %)
Аденовирусы человека	100 % (99,44 % – 100 %)	100 % (92,89 % – 100 %)
Метапневмовирус человека	100 % (99,46 % – 100 %)	100 % (86,28 % – 100 %)
Бокавирусы человека	100 % (99,46 % – 100 %)	100 % (86,77 % – 100 %)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.5. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом материале, на эффективность ОТ-ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам мазков из носо- и ротоглотки на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 18, в максимально возможной концентрации для данного вида биоматериала.

Таблица 18

Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс»

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
	муцин	0,23 мг/100 мкл
	хлоргексидин	0,1 %
	мирамистин	0,001 % действующего вещества
	ксилометазолин	0,01 %
	ДНК человека	$3{,}0\times10^7$ копий/мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

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

10.3. Хранение

Набор реагентов необходимо разукомплектовать. Контрольные образцы (ПКО ОРВИ, 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 ОРВИ-1, ПЦР-смесь ОРВИ-2 и ПЦР-смесь ОРВИ-3 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® ОРВИ-комплекс» 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		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		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления РНК вирусов парагриппа 1-4 типов, риновирусов человека, ортопневмовируса человека, коронавирусов человека 229E, HKU1, NL63, OC43, метапневмовируса человека и ДНК аденовирусов и бокавирусов человека методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс» по ТУ 21.20.23-141-09286667-2021

«АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс»

Форма выпуска 1

REF P2074-11

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

IVD

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ мазки со слизистой носо- и ротоглотки.

СОСТАВ

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смеси			
ПЦР-смесь ОРВИ-1	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин белого цвета	0,01	100 пробирок
ПЦР-смесь ОРВИ-2	Розовая жидкость, раскапана под парафин белого цвета	0,01	100 пробирок
ПЦР-смесь ОРВИ-3	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин синего цвета	0,01	100 пробирок
ПЦР-реагенты			
Буфер D	Прозрачная жидкость	1,2	3 пробирки
Taq полимераза	Прозрачная жидкость	0,12	3 пробирки
Ревертаза R	Прозрачная жидкость	0,03	3 пробирки
K-	Прозрачная жидкость	0,30	1 пробирка
Контроли			
ПКО ОРВИ	Прозрачная жидкость	0,4	1 пробирка
ВКО R	Прозрачная жидкость	1,2	1 пробирка
ОКО	Прозрачная жидкость	1,2	1 пробирка
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 1
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
Контрольные образцы (ПКО ОРВИ, ВКО R и ОКО) хранить при температуре от 2 до 8 °С. Остальные реагенты хранить при температуре от -24 до -16 °С. ПЦР-смесь ОРВИ-1, ПЦР-смесь ОРВИ-2 и ПЦР-смесь ОРВИ-3 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЭКСТРАКЦИЯ НК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции НК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс». Порядок работы с наборами для экстракции НК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции НК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
ВКО R	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент для элюции НК	50-100 мкл[1]	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб НК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Рассчитать объемы реагентов, необходимые для приготовления 3-х реакционных смесей, согласно таблице:

Компонент реакционной смеси	**Объем, мкл**	**Обозначения**
Буфер D	**10,0***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Taq полимераза	**1,0***(N+1)	
Ревертаза R	**0,25***(N+1)	

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

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционных смесей хранению не подлежат.

2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с **Буфером D**, **Taq полимеразой** и **Ревертазой R**, осадить капли на вортексе.

3. Приготовить реакционные смеси в 3-х отдельных пробирках, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смеси и осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью ОРВИ-1**, **ПЦР-смесью ОРВИ-2**, **ПЦР-смесью ОРВИ-3** для проведения ОТ-ПЦР НК исследуемых и контрольных образцов.

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

6. Внести в подготовленные пробирки реакционные смеси и образцы согласно таблице:

[1] 50 мкл при использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» (при необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл); 100 мкл при использовании наборов реагентов «МагноПрайм® ФАСТ-Р» или «МагноПрайм ЮНИ».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 10 мкл	
Приготовленных реакционных смесей	в пробирки с ПЦР-смесью ОРВИ-1, ПЦР-смесью ОРВИ-2, ПЦР-смесью ОРВИ-3 на поверхность парафина **ВНИМАНИЕ!** Реакционные смеси не должны проваливаться под парафин.
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционные смеси.	
Пробы НК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов (проба НК вносится в 3 пробирки с каждой ПЦР-смесью ОРВИ)
Пробы, экстрагированной из ОКО	в 3 пробирки с каждой ПЦР-смесью ОРВИ для образцов ОКО (отрицательного контроля экстракции)
ПКО ОРВИ	в 3 пробирки с каждой ПЦР-смесью ОРВИ для образцов ПКО (положительного контроля ОТ-ПЦР)
Реагент К-	в 3 пробирки с каждой ПЦР-смесью ОРВИ для образцов К- (отрицательного контроля ОТ-ПЦР)

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

7. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

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[2], ROX, Cy5, Cy5.5	

Примечание - Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

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

9. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание - Для удобного анализа получаемых результатов рекомендуется расположить пробирки с ПЦР-смесями в амплификатор планшетного типа в соответствии со схемой на рисунке 1: 8 пробирок с ПЦР-смесью ОРВИ-1 (белые) расположить в первом вертикальном ряду планшета, 8 пробирок с ПЦР-смесью ОРВИ-2 (розовые) – во втором ряду, 8 пробирок с ПЦР-смесью ОРВИ-3 (голубые) – в третьем. В четвертом вертикальном ряду снова поставить 8 пробирок с ПЦР-смесью ОРВИ-1 и т.д.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

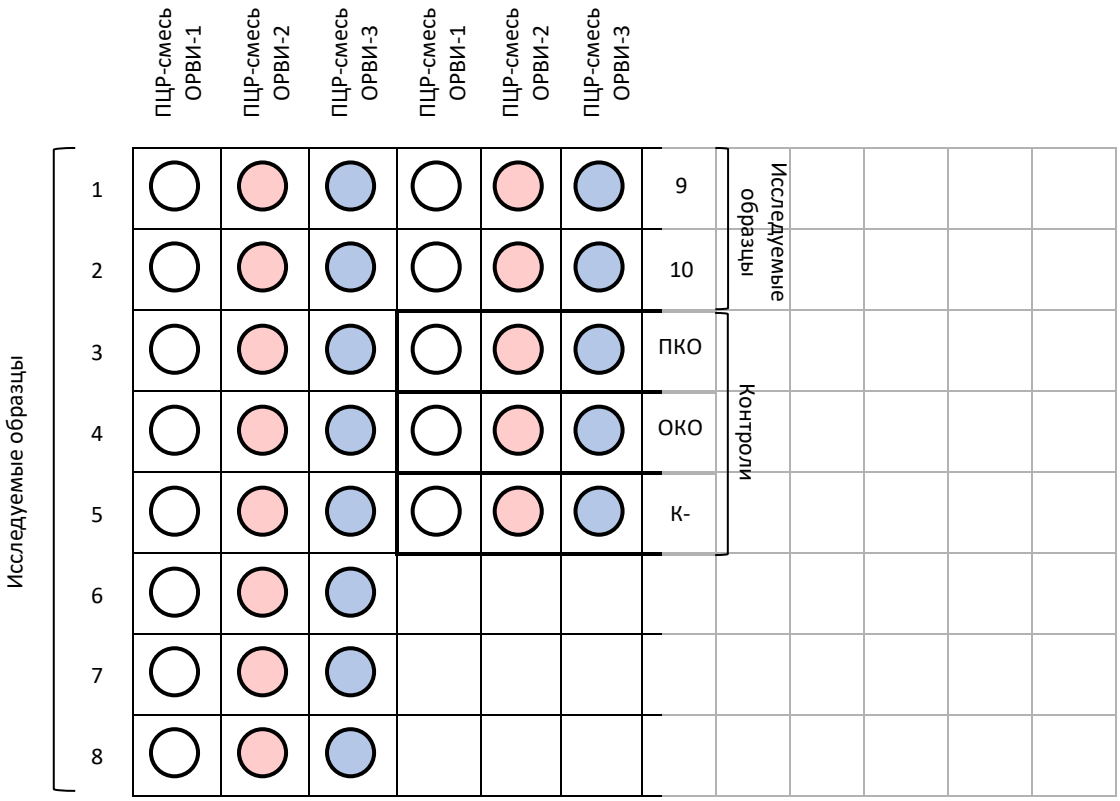


Рисунок 1 – Схема расстановки пробирок с ПЦР-смесями для 10-ти исследуемых образцов в амплификатор планшетного типа

10. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

АмплиПрайм

НекстБИО
Биотехнологическая компания

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления РНК вирусов парагриппа 1-4 типов, риновирусов человека, ортопневмовируса человека, коронавирусов человека 229E, HKU1, NL63, OC43, метапневмовируса человека и ДНК аденовирусов и бокавирусов человека методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс» по ТУ 21.20.23-141-09286667-2021

«АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс»

Форма выпуска 2

REF 2074-12

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

IVD

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ мазки со слизистой носо- и ротоглотки.

СОСТАВ

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смеси			
ПЦР-смесь ОРВИ-1	Прозрачная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь ОРВИ-2	Розовая жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь ОРВИ-3	Прозрачная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-реагенты			
Буфер С	Прозрачная жидкость	0,65	3 пробирки
Taq полимераза	Прозрачная жидкость	0,12	3 пробирки
Ревертаза R	Прозрачная жидкость	0,03	3 пробирки
К-	Прозрачная жидкость	0,30	1 пробирка
Контроли			
ПКО ОРВИ	Прозрачная жидкость	0,4	1 пробирка
ВКО R	Прозрачная жидкость	1,2	1 пробирка
ОКО	Прозрачная жидкость	1,2	1 пробирка
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 2
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
Контрольные образцы (ПКО ОРВИ, ВКО R и ОКО) хранить при температуре от 2 до 8 °С. Остальные реагенты хранить при температуре от -24 до -16 °С. ПЦР-смесь ОРВИ-1, ПЦР-смесь ОРВИ-2 и ПЦР-смесь ОРВИ-3 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЭКСТРАКЦИЯ НК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции НК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс». Порядок работы с наборами для экстракции НК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции НК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
ВКО R	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент для элюции НК	50-100 мкл[1]	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб НК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Рассчитать объемы реагентов, необходимые для приготовления 3-х реакционных смесей, согласно таблице:

Компонент реакционной смеси	**Объем, мкл**	**Обозначения**
ПЦР-смесь ОРВИ-1 / ПЦР-смесь ОРВИ-2 / ПЦР-смесь ОРВИ-3	**10,0***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Буфер С	**5,0***(N+1)	
Taq полимераза	**1,0***(N+1)	
Ревертаза R	**0,25***(N+1)	

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

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

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционных смесей с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами, указанными в таблице выше, осадить капли на вортексе.

3. Приготовить реакционные смеси в 3-х отдельных пробирках, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смеси и осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения ОТ-ПЦР НК исследуемых и контрольных образцов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

5. Внести в подготовленные пробирки реакционные смеси и образцы согласно таблице:

[1] 50 мкл при использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» (при необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл); 100 мкл при использовании наборов реагентов «МагноПрайм® ФАСТ-Р» или «МагноПрайм ЮНИ».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 15 мкл	
Приготовленных реакционных смесей	в пробирки для исследуемых и контрольных образцов
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционные смеси.	
Пробы НК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов (проба НК вносится в 3 пробирки с каждой ПЦР-смесью ОРВИ)
Пробы, экстрагированной из ОКО	в 3 пробирки с каждой ПЦР-смесью ОРВИ для образцов ОКО (отрицательного контроля экстракции)
ПКО ОРВИ	в 3 пробирки с каждой ПЦР-смесью ОРВИ для образцов ПКО (положительного контроля ОТ-ПЦР)
Реагент К-	в 3 пробирки с каждой ПЦР-смесью ОРВИ для образцов К- (отрицательного контроля ОТ-ПЦР)

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционных смесей хранению не подлежат.

6. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

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[2], ROX, Cy5, Cy5.5	

Примечание - Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

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

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

Примечание - Для удобного анализа получаемых результатов рекомендуется расположить стрипы или пробирки с ПЦР-смесями в амплификатор планшетного типа в соответствии со схемой на рисунке 1: стрип/8 пробирок с ПЦР-смесью ОРВИ-1 расположить в первом вертикальном ряду планшета, стрип/8 пробирок с ПЦР-смесью ОРВИ-2 – во втором ряду, стрип/8 пробирок с ПЦР-смесью ОРВИ-3 – в третьем. В четвертом вертикальном ряду снова поставить стрип/8 пробирок с ПЦР-смесью ОРВИ-1 и т.д.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

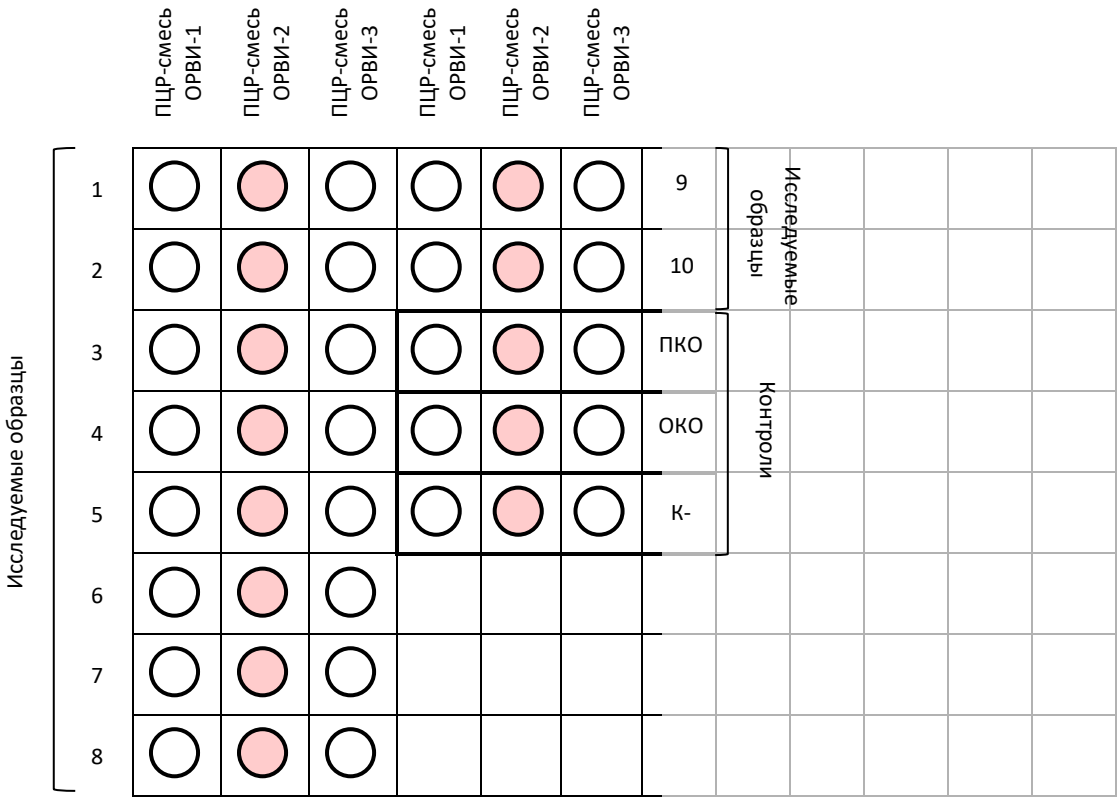


Рисунок 1 – Схема расстановки пробирок с ПЦР-смесями для 10-ти исследуемых образцов в амплификатор планшетного типа

9. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

АмплиПрайм

НекстБИО
Биотехнологическая компания

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления РНК вирусов парагриппа 1-4 типов, риновирусов человека, ортопневмовируса человека, коронавирусов человека 229E, HKU1, NL63, OC43, метапневмовируса человека и ДНК аденовирусов и бокавирусов человека методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс» по ТУ 21.20.23-141-09286667-2021

«АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс»

Форма выпуска 3

REF P2074-13

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

IVD

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим доступ в интернет). Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

✓ мазки со слизистой носо- и ротоглотки.

СОСТАВ

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смеси			
ПЦР-смесь ОРВИ-1	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин белого цвета	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]
ПЦР-смесь ОРВИ-2	Розовая жидкость, раскапана под парафин белого цвета	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]
ПЦР-смесь ОРВИ-3	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин синего цвета	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]
ПЦР-реагенты			
Буфер D	Прозрачная жидкость	1,2	3 пробирки
Taq полимераза	Прозрачная жидкость	0,12	3 пробирки
Ревертаза R	Прозрачная жидкость	0,03	3 пробирки
K-	Прозрачная жидкость	0,30	1 пробирка
Контроли			
ПКО ОРВИ	Прозрачная жидкость	0,4	1 пробирка
ВКО R	Прозрачная жидкость	1,2	1 пробирка
ОКО	Прозрачная жидкость	1,2	1 пробирка
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 3
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
Контрольные образцы (ПКО ОРВИ, ВКО R и ОКО) хранить при температуре от 2 до 8 °С. Остальные реагенты хранить при температуре от -24 до -16 °С. ПЦР-смесь ОРВИ-1, ПЦР-смесь ОРВИ-2 и ПЦР-смесь ОРВИ-3 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.

[1] Пустые пробирки не используются.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЭКСТРАКЦИЯ НК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции НК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс». Порядок работы с наборами для экстракции НК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции НК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
ВКО R	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент для элюции НК	50-100 мкл[2]	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб НК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Рассчитать объемы реагентов, необходимые для приготовления 3-х реакционных смесей, согласно таблице:

Компонент реакционной смеси	**Объем, мкл**	**Обозначения**
Буфер D	**10,0***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Taq полимераза	**1,0***(N+1)	
Ревертаза R	**0,25***(N+1)	

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

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционных смесей хранению не подлежат.

2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с **Буфером D**, **Taq полимеразой** и **Ревертазой R**, осадить капли на вортексе.

3. Приготовить реакционные смеси в 3-х отдельных пробирках, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смеси и осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью ОРВИ-1**, **ПЦР-смесью ОРВИ-2**, **ПЦР-смесью ОРВИ-3** для проведения ОТ-ПЦР НК исследуемых и контрольных образцов.

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

6. Внести в подготовленные пробирки реакционные смеси и образцы согласно таблице:

[2] 50 мкл при использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» (при необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл); 100 мкл при использовании наборов реагентов «МагноПрайм® ФАСТ-Р» или «МагноПрайм ЮНИ».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 10 мкл	
Приготовленных реакционных смесей	в пробирки с ПЦР-смесью ОРВИ-1, ПЦР-смесью ОРВИ-2, ПЦР-смесью ОРВИ-3 на поверхность парафина **ВНИМАНИЕ!** Реакционные смеси не должны проваливаться под парафин.
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционные смеси.	
Пробы НК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов (проба НК вносится в 3 пробирки с каждой ПЦР-смесью ОРВИ)
Пробы, экстрагированной из ОКО	в 3 пробирки с каждой ПЦР-смесью ОРВИ для образцов ОКО (отрицательного контроля экстракции)
ПКО ОРВИ	в 3 пробирки с каждой ПЦР-смесью ОРВИ для образцов ПКО (положительного контроля ОТ-ПЦР)
Реагент К-	в 3 пробирки с каждой ПЦР-смесью ОРВИ для образцов К- (отрицательного контроля ОТ-ПЦР)

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

7. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

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[3], ROX, Cy5, Cy5.5	

Примечание - Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

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

9. Установить стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание - Для удобного анализа получаемых результатов рекомендуется расположить стрипы с ПЦР-смесями в амплификатор планшетного типа в соответствии со схемой на рисунке 1: стрип с ПЦР-смесью ОРВИ-1 (белый) расположить в первом вертикальном ряду планшета, стрип с ПЦР-смесью ОРВИ-2 (розовый) – во втором ряду, стрип с ПЦР-смесью ОРВИ-3 (голубой) – в третьем. В четвертом вертикальном ряду снова поставить стрип с ПЦР-смесью ОРВИ-1 и т.д.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

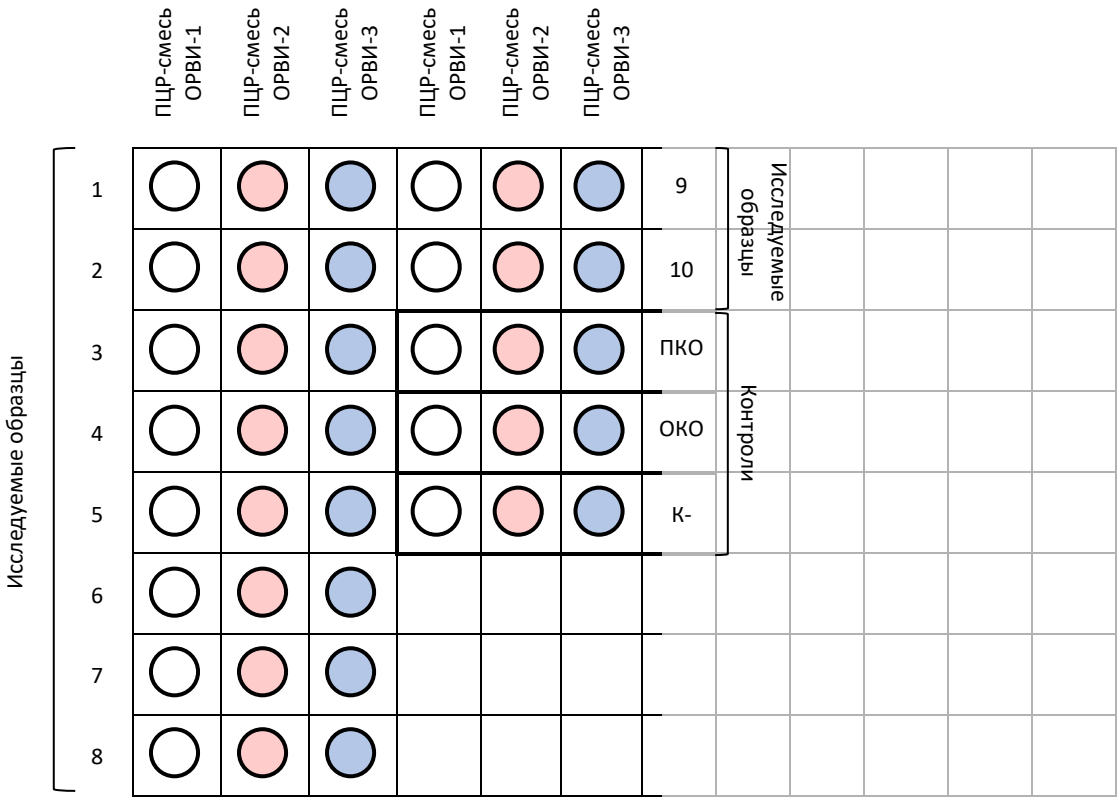


Рисунок 1 – Схема расстановки пробирок с ПЦР-смесями для 10-ти исследуемых образцов в амплификатор планшетного типа

10. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru