



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«17» августа 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для качественного и количественного
определения ДНК вируса герпеса человека 6 типа
(HHV6) методом полимеразной цепной реакции с
детекцией в режиме реального времени «HHV6-тест»
по ТУ 21.20.23-043-97638376-2021**

Содержание

Список сокращений	3
Введение	4
1. Назначение	7
2. Принцип метода	7
3. Состав набора реагентов	9
4. Характеристики набора реагентов	12
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов.....	22
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	23
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	25
8. Анализируемые образцы.....	27
9. Подготовка компонентов набора для исследования	33
10. Проведение анализа.....	34
11. Регистрация и интерпретация результатов	36
Рекомендации по установке пороговой линии	37
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов.....	41
13. Утилизация	42
14. Гарантийные обязательства, контакты	43
Приложение А.....	44

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ОКО	отрицательный контрольный образец
КО-1	калибровочный образец 1
КО-2	калибровочный образец 2
ПКО	положительный контрольный образец
КВМ	контроль взятия материала
ВГЧ-6	вирус герпеса человека 6 типа

Введение

Целевой анализ: специфичный участок геномной ДНК вируса герпеса человека 6 типа (HHV6).

Научная обоснованность целевого анализа заключается в его специфичности (уникальности последовательности ДНК) в отношении генома вируса герпеса человека 6 типа (HHV6).

Вирус герпеса 6 типа ВГЧ-6 – ДНК-вирус подсемейства *Betaherpesvirinae* рода *Roseolovirus*, имеет два серологических подтипа – 6А и 6В. ВГЧ-6 сравнительно недавно внесен в перечень известных человеческих патогенов. ВГЧ-6 – этиологический агент ряда инфекционных заболеваний: внезапной экзантемы, лихорадки с судорожным синдромом, инфекционного мононуклеоза. Кроме того, ВГЧ-6 – ко-фактор онкологических и лимфопролиферативных заболеваний (назофарингеальной карциномы, неходжкинской лимфомы, периферической Т-клеточной лейкемии, В-клеточной лимфомы, синусоидальной В-клеточной лимфомы, плеоморфной Т-клеточной лимфомы, болезни Ходжкина)¹.

В естественных условиях основным путем передачи вируса является воздушно-капельный. Не исключен вертикальный путь заражения: антигены вируса обнаружены в абортном материале при спонтанных абортах. Возможны половой путь передачи вируса и перинатальная инфекция. Длительная репродукция при острой инфекции и персистенция ВГЧ-6 в клетках крови внешне здоровых людей, включая доноров, являются серьезными факторами риска передачи вируса при переливании крови и ее компонентов, трансплантации органов и тканей².

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний.

¹ Мелехина Е.В., Чугунова О.Л., Николич А.Д., и др. Течение инфекции, ассоциированной с вирусом герпеса человека 6-го типа у детей // Детская больница. – 2013. - №4.

² Савенкова М.С., Вашура Л.В. Герпес 6-го типа: эпидемиология, диагностика, клинические варианты течения // Эффективная фармакотерапия. Педиатрия. - №2 (23).

Показания к применению: набор реагентов «HNV6-тест» рекомендуется использовать в клинической лабораторной диагностике для исследования клинического материала (цельная кровь, лейкоциты крови, мазки из ротоглотки, слюны, биоптаты внутренних органов, спинномозговая жидкость, моча), у пациентов с подозрением на инфицирование герпесвирусной инфекцией вне зависимости от формы и стадии заболевания всех групп населения.

Противопоказания к применению: при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению не выявлены.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия: популяционных, демографических аспектов применения набора реагентов «HNV6-тест» не выявлено.

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

1.1. Назначение: набор реагентов «HNV6-тест» предназначен для качественного и количественного определения ДНК вируса герпеса человека 6 типа (HNV6) методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени в пробе ДНК, выделенной из клинического материала (цельная кровь, лейкоциты крови, мазки из ротоглотки, слюны, биоптаты внутренних органов, спинномозговая жидкость, моча), у пациентов с подозрением на инфицирование герпесвирусной инфекцией вне зависимости от формы и стадии заболевания всех групп населения.

Функциональное назначение – полученные результаты могут использоваться для ранней диагностики герпесвирусной инфекции у пациентов вне зависимости от формы и стадии заболевания всех групп населения. Результаты учитываются в комплексной диагностике заболевания.

Потенциальные потребители медицинского изделия

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях. Профессиональный уровень потенциальных пользователей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

2. Принцип метода

Метод

Качественная и количественная аллель-специфическая полимеразная цепная реакция (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенной из цельной крови, лейкоцитов крови, мазков из ротоглотки, слюны, биоптатов внутренних органов, спинномозговой жидкости, мочи.

Принцип определения

Процесс амплификации ДНК методом ПЦР, лежащий в основе работы тест-системы, происходит в реакционном буфере при помощи

специфичных к соответствующим участкам ДНК праймеров и фермента *Taq*-полимеразы и заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК и отжига праймеров.

В составе ПЦР-смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются *Taq*-полимеразой, в результате чего разобщаются краситель и тушител, и происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор содержит реагенты для определения высокоспецифичных участков ДНК вируса герпеса человека 6 типа, а также геномной ДНК человека (контроля взятия материала, далее KBM) (табл. 1)

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору	
FAM/Green	HEX/Yellow
ДНК вируса герпеса человека 6 типа	KBM

KBM позволяет оценить эффективность выделения ДНК и возможного наличия ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

Ограничения метода

Возможная причина получения ложноположительного результата – контаминация на этапе выделения ДНК или проведения реакции ПЦР. Ложноположительный результат может быть выявлен с помощью отрицательного контрольного образца.

Набор реагентов по истечении срока годности применению не подлежит.

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

Набор реагентов, транспортированный или хранившийся с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах исследования с использованием данного МИ. В диагностических целях результаты должны использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования другими тест-системами, применяемой терапией.

Общее время проведения анализа составляет 65 мин (без учета пробоподготовки).

3. Состав набора реагентов

Форма комплектации

Набор реагентов «ННУ6-тест» выпускается в 1 форме комплектации – «ННУ6-тест».

Количество анализируемых проб

Каждый набор «ННУ6-тест» содержит реагенты, рассчитанные на проведение 96 реакций, что соответствует:

- определению 94 исследуемых образцов, отрицательного и положительного контрольных образцов или 32 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке при проведении качественного анализа;

- определению 91 исследуемого образца, калибровочных образцов и отрицательного контрольного образца или 16 единичным постановок исследуемых образцов с калибровочными образцами и отрицательным контрольным образцом в каждой постановке при проведении количественного анализа.

Состав набора реагентов

Таблица 2 – Состав набора реагентов «ННУ6-тест»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1	ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 384 мкл
2	Праймер-микс	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 960 мкл

3	КО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1600 мкл
4	КО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1600 мкл
5	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 192 мкл
6	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1600 мкл

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

ПЦР-буфер готов к использованию и содержит все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты, урацил-ДНК-гликозидазу и оптимизированный буфер.

Праймер-микс готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. праймеры и зонд к специфичному участку геномной ДНК вируса герпеса человека 6 типа, детекция осуществляется по каналу FAM/Green;

2. праймеры и зонд к KBM, детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Прохождение реакции по HEX/Yellow $Ct \leq 32$ говорит о достаточном качестве забора материала, эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР. При отсутствии реакции по каналу HEX/Yellow или $Ct > 32$ и одновременном отсутствии реакции по каналу спецификации FAM/Green результат следует считать невалидным, для данного образца необходимо провести повторное исследование, начиная с выделения ДНК. В случае повторения невалидного результата – заново произвести забор биоматериала у данного пациента.

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с

синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК: специфичный фрагмент ДНК вируса герпеса человека 6 типа и участок гена СОМТ. ПКО находится в 10% ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА).

Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к использованию и представляет собой деионизованную воду, свободную от ДНКаз.

Калибровочный образец КО-1 представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК вируса герпеса человека 6 типа и участка гена СОМТ человека с концентрацией 1×10^6 копий/мл в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

Калибровочный образец КО-2 представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК вируса герпеса человека 6 типа и участка гена СОМТ человека с концентрацией 1×10^4 копий/мл в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

4. Характеристики набора реагентов

4.1. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Набор реагентов «ННУ6-тест»

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
1. Технические характеристики		
1) Внешний вид		
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
КО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
КО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-043-97638376-2021	Раздел 7, пункт 7.9
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-043-97638376-2021	Раздел 7, пункт 7.9
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-043-97638376-2021	Раздел 7, пункт 7.9
2. Функциональные характеристики		
2.1 Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM Ct \leq 32, HEX Ct \leq 32.	Раздел 7, пункт 7.7.2
2.2 Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM и HEX Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует)	Раздел 7, пункт 7.7.2
2.3 Прохождение реакции в пробирках с КОС	В пробирках с КОС по каналу FAM Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), а по каналу HEX Ct \leq 32.	Раздел 7, пункт 7.7.2
2.4 Прохождение реакции в пробирках с КОЧ	В пробирках с КОЧ по каналу FAM во всех повторях (не менее 4) Ct \leq 35 и при значении стандартного отклонения в повторях КОЧ не более 5%, а по каналу HEX Ct \leq 32.	Раздел 7, пункт 7.7.2

2.5 Тест на "линейность"	Коэффициент корреляции КО-1, КО-2 и стандартного образца (СО) не менее 0,98	Раздел 7, пункт 7.7.2
2.6 Тест на прецизионность: коэффициент вариации (КВ) в условиях повторяемости	Коэффициент вариации C_t у повторов каждого калибровочного образца КО-1 и КО-2 в условиях повторяемости составляет не более 5%.	Раздел 7, пункт 7.7.2
2.7 Тест на правильность определения концентрации	Полученное значение концентрации ДНК вируса герпеса человека 6 типа должно соответствовать концентрации, приведенной в паспорте стандартного образца СОП1 ($6 \log_{10}$ копий/мл) и СОП2 ($4 \log_{10}$ копий/мл), с допуском $\pm 0,4 \log_{10}$ копий/мл концентрации	Раздел 7, пункт 7.7.2

В случае неисправности медицинского изделия, отклонений в его функционировании, которые могут влиять на безопасность, изменений аналитических характеристик изделия незамедлительно прекратить применение медицинского изделия и сообщить производителю (см. раздел 14 Инструкции).

4.2. Характеристики аналитической эффективности

4.2.1. Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к ДНК вируса герпеса человека 6 типа (HHV6).

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце геномной НК следующих организмов и вирусов: вирус простого герпеса 1 и 2 типа, вирус Эпштейна-Барр, вирус герпеса 8 типа, вирус ветряной оспы (вирус Варицелла-Зостер), *Parvovirus* B19, цитомегаловирус человека, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*.

4.2.2 Предел обнаружения

В соответствии ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом международных рекомендаций **CLSI EP-17A2** предел обнаружения (LOD) определяли методом анализа разведений Международного стандарта – WHO International Standard 1st WHO International Standard for HHV-6B virus DNA NIBSC code: 15/266/.

По результатам исследования предел обнаружения ДНК HHV6 в образцах объемом 100 мкл с частотой выявления 95% при использовании набора для выделения «НК-Экстра» (ПУ № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.) для амплификатора:

- ДТпрайм – 368 копий/мл (95% ДИ: 296,4 – 439,5 копий/мл), 206,1 МЕ/мл (95% ДИ: 163,1 – 249,0 МЕ/мл);
- CFX 96 – 380 копий/мл (95% ДИ: 308,4 – 451,5), 212,8 МЕ/мл (95% ДИ: 169,8 – 255,7 МЕ/мл);
- Rotor-Gene Q – 379 копий/мл (95% ДИ: 307,4 – 450,5), 212,2 МЕ/мл (95% ДИ: 169,2 – 255,1 МЕ/мл);
- Quant Studio 5 – 370 копий/мл (95% ДИ: 298,4 – 441,5), 207,2 МЕ/мл (95% ДИ: 164,2 – 250,1 МЕ/мл).

По результатам исследования предел обнаружения ДНК HHV6 в образцах объемом 100 мкл с частотой выявления 95% при использовании набора для выделения «РИБО-сорб» (ПУ № ФСР 2008/03993 от 22.02.2019 г.) для амплификатора:

- ДТпрайм – 373,8 копий/мл (95% ДИ: 302,2 – 445,3 копий/мл), 209,3 МЕ/мл (95% ДИ: 166,3 – 252,2 МЕ/мл);
- CFX 96 – 374,5 копий/мл (95% ДИ: 302,9 – 446,1), 209,7 МЕ/мл (95% ДИ: 166,7 – 252,6 МЕ/мл);
- Rotor-Gene Q – 377,5 копий/мл (95% ДИ: 305,9 – 449,1), 211,4 МЕ/мл (95% ДИ: 168,4 – 254,3 МЕ/мл);
- Quant Studio 5 – 374,4 копий/мл (95% ДИ: 302,8 – 445,9), 209,7 МЕ/мл (95% ДИ: 166,7 – 252,6 МЕ/мл).

4.2.3 Предел количественного определения

В соответствии ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом международных рекомендаций **CLSI EP-17A2** предел количественного определения (LOQ) установлен методом анализа разведений Международного стандарта – WHO International Standard 1st WHO International Standard for HHV-6B virus DNA NIBSC code: 15/266.

По результатам исследования предел количественного определения (LOQ) ДНК HHV6 в образцах объемом 100 мкл с частотой выявления 95% при использовании набора для выделения «НК-Экстра» (ПУ № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.) для амплификатора:

- ДТпрайм – 401,6 копий/мл (95% ДИ: 330,0 – 473,1 копий/мл), 224,9 МЕ/мл (95% ДИ: 181,9 – 267,8 МЕ/мл);

- CFX 96 – 403,6 копий/мл (95% ДИ: 332,0 – 475,1), 226,0 МЕ/мл (95% ДИ: 183,0 – 268,9 МЕ/мл);
- Rotor-Gene Q – 407,2 копий/мл (95% ДИ: 335,6 – 478,7), 228,0 МЕ/мл (95% ДИ: 185,0 – 270,9 МЕ/мл);
- Quant Studio 5 – 404,2 копий/мл (95% ДИ: 332,6 – 475,7), 226,4 МЕ/мл (95% ДИ: 183,4 – 269,3 МЕ/мл).

По результатам исследования предел количественного определения (LOQ) ДНК HHV6 в образцах объемом 100 мкл с частотой выявления 95% при использовании набора для выделения «РИБО-сорб» (РУ № ФСР 2008/03993 от 22.02.2019 г.) для амплификатора:

- ДТпрайм – 403,7 копий/мл (95% ДИ: 332,1 – 475,2 копий/мл), 226,1 МЕ/мл (95% ДИ: 183,1 – 269,0 МЕ/мл);
- CFX 96 – 400,6 копий/мл (95% ДИ: 329,0 – 472,1), 224,4 МЕ/мл (95% ДИ: 181,4 – 267,3 МЕ/мл);
- Rotor-Gene Q – 403,7 копий/мл (95% ДИ: 332,1 – 475,2), 226,0 МЕ/мл (95% ДИ: 183,0 – 268,9 МЕ/мл);
- Quant Studio 5 – 401,4 копий/мл (95% ДИ: 329,8 – 472,9), 224,8 МЕ/мл (95% ДИ: 181,8 – 267,7 МЕ/мл).

4.2.4 Линейный диапазон измерения

Линейный диапазон измерения был верифицирован с помощью международного стандарта – WHO International Standard 1st WHO International Standard for HHV-6B virus DNA NIBSC code: 15/266.

На основании результатов исследования линейного диапазона можно заключить, что для образцов объемом 100 мкл результаты анализа набором реагентов «HHV6-тест» являются линейными в диапазоне от 400 копий/мл до 10^7 копий/мл (от 224 МЕ/мл до $5,6 \cdot 10^6$ МЕ/мл).

4.2.5 Прецизионность в условиях повторяемости и воспроизводимости:

1. Коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 3%;

2. Коэффициент вариации в условиях воспроизводимости набора составляет не более 5%.

4.3. Характеристики клинической эффективности

Для проведения клинических испытаний было использовано **238 образцов клинического материала человека** (45 – цельной крови, 40 – лейкоцитов крови, 40 – мазков из ротоглотки, 45 – слюны, 14 – биоптатов внутренних органов, 14 – спинномозговой жидкости, 40 – мочи), от пациентов с установленным диагнозом инфицирования герпесвирусной инфекцией, вызванной вирусом герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6), вне зависимости от формы и стадии заболевания всех групп населения.

Биологический референтный интервал ДНК вируса герпеса человека 6 типа в исследуемой популяции пациентов в возрасте от 6 месяцев до 45 лет составлял от 516 копий/мл до 795507 копий/мл.

Для оценки диагностической специфичности и перекрестной реактивности в клинических испытаниях испытуемым набором реагентов «ННВ6-тест» были исследованы также **158 образцов клинического материала человека** (27 – цельной крови, 26 – лейкоцитов крови, 28 – мазков из ротоглотки, 28 – слюны, 12 – биоптатов внутренних органов, 12 – спинномозговой жидкости, 25 – мочи), не содержащих ДНК ВГЧ-6, но с подтвержденным положительным наличием геномной НК следующих организмов и вирусов: вирус простого герпеса 1 и 2 типа, вирус Эпштейна-Барр, вирус герпеса 8 типа, вирус ветряной оспы (вирус Варицелла-Зостер), *Parvovirus* B19, цитомегаловирус человека, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*.

Такое количество образцов выбрано с учетом требований **ГОСТ Р 51352-2013** и с учетом рекомендаций Международного руководства **CLSI EP09-A3**.

Каждый образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК вируса герпеса человека 6 типа (ННВ6) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «ННВ6-тест» по ТУ 21.20.23-043-97638376-2021», производства ООО «ТестГен» и наборов сравнения:

- при исследовании образцов цельной крови, лейкоцитов крови, мазков из ротоглотки, слюны, биоптатов внутренних органов,

спинномозговой жидкости: Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса герпеса 6 типа (HHV6) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HHV6-скрин-титр-FL» по ТУ 9398-094-01897593-2012, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия (регистрационное удостоверение № ФСР 2010/09506 от 13.03.2019);

- при исследовании образцов мочи: Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса человека (CMV) и герпеса 6 типа (HHV6) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени "АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6" по ТУ 21.20.23-090-09286667-2020, производства ООО "НекстБио" (РУ № РЗН 2021/15314 от 17.09.2021).

Свидетельством правильности работы исследуемого медицинского изделия было совпадение результатов.

Выделение ДНК из клинических образцов осуществлялось с помощью следующих наборов для экстракции ДНК:

- для выделения ДНК из крови, мазков из ротоглотки, мочи: Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала «НК-Экстра» по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.);

- для выделения ДНК из лейкоцитов крови, слюны, биоптата внутренних органов, спинномозговой жидкости: Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» по ТУ 9398-004-01897593-2008 производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03993 от 22.02.2019 г.).

Для проведения ПЦР-исследования набором реагентов «HHV6-тест» были использованы амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США);

- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия);

- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США).

4.3.1 Результаты изучения диагностических характеристик по образцам клинического материала представлены в таблице 7.

Вид исследуемого материала	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95%	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95%
Цельная кровь	90	54	100% (95% ДИ: 95,98% - 100%)	100% (95% ДИ: 93,40% - 100%)
Лейкоциты крови	80	52	100% (95% ДИ: 98,70% - 100%)	100% (95% ДИ: 93,15% - 100%)
Мазки из ротоглотки	80	56	100% (95% ДИ: 95,49% - 100%)	100% (95% ДИ: 93,62% - 100%)
Слюна	90	56	100% (95% ДИ: 95,98% - 100%)	100% (95% ДИ: 93,62% - 100%)
Биоптаты внутренних органов	84	72	100% (95% ДИ: 95,70% - 100%)	100% (95% ДИ: 95,01% - 100%)
Спинномозговая жидкость	84	72	100% (95% ДИ: 95,70% - 100%)	100% (95% ДИ: 95,01% - 100%)
Моча	80	50	100% (95% ДИ: 95,49% - 100%)	100% (95% ДИ: 92,89% - 100%)

4.3.2 Сравнение методов: точность

Данные, полученные при тестировании **238 образцов клинического материала человека** (45 – цельной крови, 40 – лейкоцитов крови, 40 – мазков из ротоглотки, 45 – слюны, 14 – биоптатов внутренних органов, 14 – спинномозговой жидкости, 40 – мочи), от пациентов с установленным диагнозом инфицирования герпесвирусной инфекцией, вызванной вирусом герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6), позволяют сделать вывод о достоверном соответствии результатов количественного определения концентрации ДНК вируса герпеса человека 6 типа (HHV6) в клинических образцах, полученных с помощью **испытуемого МИ** «Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК вируса герпеса человека 6 типа (HHV6) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «HHV6-тест» по ТУ 21.20.23-

043-97638376-2021», производства ООО «ТестГен» и **набора сравнения:**

- при исследовании образцов цельной крови, лейкоцитов крови, мазков из ротоглотки, слюны, биоптатов внутренних органов, спинномозговой жидкости: Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса герпеса 6 типа (HHV6) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HHV6-скрин-титр-FL» по ТУ 9398-094-01897593-2012, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия (регистрационное удостоверение № ФСР 2010/09506 от 13.03.2019);

- при исследовании образцов мочи: Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса человека (CMV) и герпеса 6 типа (HHV6) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6» по ТУ 21.20.23-090-09286667-2020, производства ООО «НекстБио» (РУ № РЗН 2021/15314 от 17.09.2021).

При проведении ПЦР-анализа с использованием **амплификаторов:**

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), регистрационное удостоверение № ФСР 2011/10228 от 03 марта 2011 г.;

- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2008/03399 от 21 июня 2016 года;

- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010;

- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США), регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8446 от 06 июня 2019 года.

Систематическая погрешность измерения логарифма концентрации ДНК ВГЧ-6 не превышает 3%.

*Результаты статистической обработки полученных данных
по сравнению методов (точность) в соответствии с
рекомендациями документа CLSI EP09-A3 с использованием метода
регрессии и корреляции.*

	Тип образца	Ед. изм	Использу емый амплифи катор	Кол- во проб	Коефф. коррел.	Пересе- чение	Наклон
Набор реагентов «HNV6-тест», производства ООО «ТестГен» в сравнении с набором реагентов «АмплиСенс® HNV6-скрин- титр-FL», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзор а, Россия, (РУ № ФСР 2008/02552 от 22.11.2019)	Цельная кровь	log10 копии/ мл	ДТпрайм	45	0,9936	0,0098	0,9961
			CFX 96	45	0,9938	0,0225	0,9942
			Rotor- Gene Q	45	0,9933	0,0361	0,9885
			Quant Studio 5	45	0,9955	0,016	0,9951
	Лейкоциты крови	log10 копии/ мл	ДТпрайм	40	0,9912	0,0246	0,9947
			CFX 96	40	0,992	0,0034	1,0008
			Rotor- Gene Q	40	0,9978	0,0832	0,9799
			Quant Studio 5	40	0,9936	-0,0048	1,0006
	Мазки из ротоглотки	log10 копии/ мл	ДТпрайм	40	0,9958	0,0804	0,9823
			CFX 96	40	0,9961	0,9907	0,0349
			Rotor- Gene Q	40	0,9964	0,0513	0,9868
			Quant Studio 5	40	0,9959	0,0425	0,9881
	Слюна	log10 копии/ мл	ДТпрайм	45	0,9928	0,1015	0,9928
			CFX 96	45	0,9942	0,0479	0,99
			Rotor- Gene Q	45	0,9942	0,0664	0,9823
			Quant Studio 5	45	0,998	-0,0048	1,0006
	Биоптаты внутренних органов	log10 копии/ мл	ДТпрайм	42	0,9907	-0,0867	1,031
			CFX 96	42	0,9908	-0,0369	1,0153
			Rotor- Gene Q	42	0,9938	-0,0417	1,0179
			Quant Studio 5	42	0,9925	-0,1029	1,0354
	Спинномозг овая жидкость	log10 копии/ мл	ДТпрайм	42	0,9949	0,0417	0,9876
			CFX 96	42	0,9927	0,0301	0,9905
			Rotor- Gene Q	42	0,9932	0,0615	0,9816
			Quant Studio 5	42	0,9912	0,0814	0,9765
Набор реагентов «HNV6-тест»,	Моча		ДТпрайм	40	0,9909	0,0056	0,9942
			CFX 96	40	0,9932	0,0436	0,9901

производства ООО «ТестГен» в сравнении с набором реагентов «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзор а, Россия, (ПУ № РЗН 2021/15314 от 17.09.2021)		log10 копии/ мл	Rotor- Gene Q	40	0,9938	0,0211	0,9968
			Quant Studio 5	40	0,9909	-0,0096	1,0036

4.3.3 Результаты определения межлотовой корреляции

Для определения межлотовой корреляции результатов измерений в клинических образцах в соответствии с международным руководством CLSI EP09-A3 строилась диаграмма рассеяния зависимой переменной X – концентрация ДНК ВГЧ-6 с использованием испытуемого набора «HHV6-тест», производства ООО «ТестГен», **LOT: 202206-201**, и Y – концентрация ДНК ВГЧ-6 с использованием испытуемого набора «HHV6-тест», производства ООО «ТестГен», **LOT: 202206-202**.

Результаты статистической обработки полученных данных по определению межлотовой корреляции в соответствии с рекомендациями документа CLSI EP09-A3 с использованием метода регрессии и корреляции

Тип образца	Ед. изм	Используемый амплификатор	Кол-во проб	Кэфф. коррел.	Пересечение	Наклон
Цельная кровь	log10 копии/мл	ДТпрайм	45	0,9932	0,016	0,9977
		CFX 96	45	0,9927	-0,004	1,0031
		Rotor-Gene Q	45	0,9921	-0,0172	1,0074
		Quant Studio 5	45	0,9915	0,0089	0,9996
Лейкоциты кровь	log10 копии/мл	ДТпрайм	40	0,9912	- 0,0459	1,0162
		CFX 96	40	0,9901	- 0,0431	1,0117
		Rotor-Gene Q	40	0,9911	0,1147	0,9695
		Quant Studio 5	40	0,9922	0,1308	0,9665
Мазки из ротоглотки	log10 копии/мл	ДТпрайм	40	0,9948	- 0,047	1,0097
		CFX 96	40	0,9935	- 0,0109	1,0017
		Rotor-Gene Q	40	0,9947	- 0,0046	1,0036

		Quant Studio 5	40	0,993	- 0,0621	1,0148
Слюна	log10 копии/мл	ДТпрайм	45	0,9921	0,0035	1,0008
		CFX 96	45	0,9918	0,1349	0,964
		Rotor-Gene Q	45	0,994	- 0,0081	1,0003
		Quant Studio 5	45	0,9924	0,0164	0,9943
Моча	log10 копии/мл	ДТпрайм	40	0,9868	- 0,0007	1,0041
		CFX 96	40	0,9864	0,1461	0,9619
		Rotor-Gene Q	40	0,9843	0,066	0,9798
		Quant Studio 5	40	0,9912	- 0,1202	1,0299
Биоптаты внутренних органов	log10 копии/мл	ДТпрайм	42	0,9953	0,0579	0,9848
		CFX 96	42	0,9979	0,0519	0,983
		Rotor-Gene Q	42	0,9932	0,0577	0,9795
		Quant Studio 5	42	0,9962	0,022	0,9946
спинномозг овая жидкость	log10 копии/мл	ДТпрайм	42	0,9923	0,0912	0,9728
		CFX 96	42	0,9927	0,0584	0,9856
		Rotor-Gene Q	42	0,9907	- 0,0718	1,0237
		Quant Studio 5	42	0,9916	- 0,0278	1,0084

Полученные данные позволяют сделать вывод о достоверном соответствии результатов количественного определения концентрации ДНК ВГЧ-6 в клинических образцах, полученных с помощью разных лотов испытуемого МИ «Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК вируса герпеса человека 6 типа (HHV6) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «HHV6-тест» по ТУ 21.20.23-043-97638376-2021», производства ООО «ТестГен».

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. Потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
2. Загрязнение клинического материала ингибирующими веществами в концентрациях, превышающих допустимые;
3. Контаминация реакционных смесей и образцов исследуемой ДНК содержимым из пробирки ПКО или продуктами амплификации;
4. Проведение анализа с использованием пробы ДНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);

5. Невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;

6. Использование непригодного для применения набора (использование по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия Набора реагентов для качественного и количественного определения ДНК вируса герпеса человека 6 типа (Human Herpes Virus 6, HHV6) методом ПЦР-РВ «HHV6-тест» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2Б – в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

Реагенты набора не горючие. Внешняя упаковка не является самовоспламеняемой, взрывоопасной. Реагенты, входящие в набор «HHV6-тест», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «HHV6-тест» не токсичны, поскольку готовятся путем смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность, проводят в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических 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». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (МУ 287-113), МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы в соответствии с действующими правилами и нормативами;

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;

- лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса;

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

- поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ

необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин;

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- набор реагентов по истечении срока годности применению не подлежит;

- не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию;

- допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по ПЦР-диагностике, а также лаборант со средним специальным медицинским образованием);

- использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно мыть руки по окончании работы;

- все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. При попадании на кожу или слизистые оболочки компонентов набора место контакта необходимо промыть большим количеством воды.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Оборудование:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Вортекс;

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема;

4. Холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С;

5. Амплификатор³ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow: CFX96 (BioRad, США, РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 от 03.03.2011), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия, № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientificб США, РУ № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free».

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл;

2. Одноразовые пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл;

3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой для ПЦР:

- пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл,
- пробирки для ПЦР объемом 0,1-0,2 мл в стрипах,
- планшеты для ПЦР с оптически прозрачной пленкой.

4. Отдельный халат и одноразовые перчатки без талька;

5. Емкость с дезинфицирующим раствором;

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл;

7. Для взятия мазка из ротоглотки рекомендуется использовать «Зонд медицинский одноразовый стерильный по ТУ 32.50.13-002-28731857-2020», производства ООО «ФармМедПолис РТ», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2021/13989 от 26.11.2021);

³ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

8. При взятии мазков из ротоглотки – стерильный физиологический раствор или фосфатный буферный (PBS) раствор;
9. Набор для выделения ДНК (см. п. 8.8 Инструкции).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенной из цельной крови, лейкоцитов крови, мазков из ротоглотки, слюны, биоптатов внутренних органов, спинномозговой жидкости, мочи.

8.1 Процедура взятия цельной периферической венозной крови человека

Для получения плазмы периферическую венозную кровь (не менее 4–5 мл) отбирают в пробирку с добавленной в качестве антикоагулянта EDTA-K2. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2–3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина и цитрата натрия в качестве антикоагулянта.

Условия транспортирования и хранения исходного клинического материала:

- при температуре от +2 °С до +8 °С – не более 6 часов;
- при комнатной температуре – не более 2 часов.

ВНИМАНИЕ! Важно исключить замораживание и прогрев пробирки с кровью выше +25°С.

Не брать в работу гемолизированную и хилезную кровь. При постановке анализа таких образцов могут получиться недостоверные результаты!

8.2 Процедура получения лейкоцитов крови

Получают из цельной периферической и/или пуповинной крови. Кровь может храниться при комнатной температуре в течение 6 часов с момента взятия. Для отбора белых клеток пробирку с кровью центрифугировать в течение 20 минут при 3 000 об/мин. Используя наконечник с фильтром аккуратно собрать лейкоцитарную массу с поверхности осадка клеток в объеме 0,2 мл и перенести в стерильную пробирку объемом 1,5–2,0 мл.

Условия хранения:

- при температуре не выше минус 68°C в течение длительного времени.

8.3 Процедура получения и пробоподготовки мочи.

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный флакон или контейнер на 50–60 мл. Сбор мочи проводится после тщательного туалета наружных половых органов, чтобы в мочу не попали выделения из них.

Процедура пробоподготовки

Взбалтывают флакон с мочой. Переносят 1,0 мл мочи, используя наконечник с фильтром в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугируют 5 мин при 12 000 об/мин. При наличии большого количества солей ресуспендируют только верхний слой осадка солей в объеме 1,0 мл и затем снова концентрируют. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой (или дозатор с переменным объемом), полностью удаляют супернатант, используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра, не захватывая осадок. К осадку добавляют транспортную среду до конечного объема 0,2 мл и тщательно перемешивают на вортексе.

Условия хранения и перевозки материала и предварительно обработанных проб:

- при температуре от +2 до +8°C – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20°C – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C – длительно.

8.4 Процедура получения спинномозговой жидкости

Спинномозговую жидкость в количестве не менее 1,0 мл собирают, используя одноразовые иглы, в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

ВНИМАНИЕ! Предварительная обработка проб не требуется.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от +2 до +8°C – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20°C – в течение 1 недели;

- при температуре минус 70°C – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание/оттаивание материала.

8.5 Процедура получения мазков из ротоглотки

Мазки берут сухими ватными тампонами на пластиковой основе вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку типа Эппендорф с 500 мкл стерильного физиологического раствора или фосфатного буферного (PBS) раствора и аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом внутри. Пробирку плотно закрывают крышкой.

ВНИМАНИЕ! Предварительная обработка проб не требуется.

Условия хранения материала:

- при комнатной температуре – в течение 6 ч;
- при температуре от +2 до +8°C – в течение 3 суток;
- при температуре минус 20°C – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание/оттаивание материала.

8.6 Процедура получения слюны

Перед получением слюны проводят трехкратное полоскание полости рта физиологическим раствором. Слюну забирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой.

ВНИМАНИЕ! Предварительная обработка проб не требуется.

Условия хранения материала:

- при комнатной температуре – в течение 6 ч;
- при температуре от +2 до +8°C – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20°C – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание/оттаивание материала.

8.7 Процедура получения и пробоподготовки биоптатов

Пунктаты (микробиоптаты) помещают в микропробирки с закручивающимися крышками или пробирки объемом 1,5 мл типа Эппендорф, содержащие 0,1 мл транспортной среды.

ВНИМАНИЕ! Предварительная обработка проб не требуется.

Макробиоптаты – кусочки ткани массой 0,1–1,0 г помещают в охлажденную фарфоровую ступку и добавляют охлажденный изотонический раствор хлорида натрия объемом 0,5–1,0 мл. измельчают стерильными ножницами с последующим растиранием пестиком. Через ватный тампон отбирают надосадочную жидкость (0,1–0,2 мл) стерильным наконечником с фильтром в стерильные микропробирки.

8.8 Процедура выделения ДНК из биологического материала

Для выделения пробы геномной ДНК человека из биологического материала рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- при использовании в качестве клинического материала крови, мазков из ротоглотки, мочи: Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала «НК-Экстра» по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.);

- при использовании в качестве клинического материала лейкоцитов крови, слюны, биоптата внутренних органов, спинномозговой жидкости: Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» по ТУ 9398-004-01897593-2008 производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03993 от 22.02.2019 г.).

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из исследуемых клинических образцов необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (ОКО)

и калибровочные образцы КО-1 и КО-2 в объеме 100 мкл, входящие в состав набора реагентов «ННУ6-тест».

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК:

- при температуре от +2 до +8°C – не более суток (24 ч);
- при температуре от минус 18 до минус 22°C – не более месяца;
- при температуре -80°C – длительно.

8.9 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «ННУ6-тест» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «ННУ6-тест», и, предположительно, влиять на способность набора реагентов выдавать достоверные результаты.

Интерферирующие вещества могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

- 1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);
- 2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов (например, гемоглобин крови);
- 3) вещества, встречающиеся при процедуре забора клинического материала – в данном случае, антикоагулянты.

Исследованные концентрации интерферирующих веществ, которые приведены в таблице 4.

Таблица 4

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества и антикоагулянты	
Гемоглобин	260 мкг/мл
Холестерин	150 мг/дл
Триглицериды	250 мг/дл
Экзогенные интерферирующие вещества	
Вещества, встречающиеся при процедуре забора клинического материала	
Гепарин (антикоагулянт)	0,15 МЕ/мл
Цитрат натрия (антикоагулянт)	0,1 мМ/мл
EDTA-K2 (антикоагулянт)	0,5 мМ/мл
При антикоагулянтной терапии	
Гепарин	1 МЕ/мл
Препараты, назначаемые при герпесвирусной инфекции	
Ацикловир	2,37 мкг/100мкл

На основании результатов исследования к ингибиторам ПЦР при проведении анализа отнесены следующие вещества:

1) антикоагулянты – гепарин в концентрации 0,15 копий/мл и цитрат натрия в концентрации 0,1 мМ/мл. Не допускается использование гепарина и цитрата натрия в качестве антикоагулянта при взятии периферической крови;

2) гепарин в концентрации 1 копий/мл, применяемый при антикоагулянтной терапии. Наличие гепарина в крови у пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии, может привести к получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови у таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание);

- не допускается использование образцов, загрязненных посторонним биологическим материалом;

- не брать в работу гемолизированную и хилезную кровь. При постановке анализа таких образцов могут быть получены недостоверные результаты;

- для исследования не пригодны образцы крови, взятые в пробирки с гепарином или цитратом натрия в качестве антикоагулянта;

- наличие гепарина в крови у пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии, может привести к получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови у таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать согласно таблице 5 в ПЦР-пробирках перед проведением анализа.

Подготовка компонентов набора для исследования

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа ДНК, ОКО, КО-1, КО-2, прошедших этап выделения ДНК, Праймер-микс, ПЦР-буфер, ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 сек., а затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием;

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

Перед проведением ПЦР необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нем с применением дезинфицирующих средств, пригодных для

использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20–30 минут.

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

1. Подготовка ПЦР;
2. Амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;
3. Интерпретация результатов (подробно описано в главе 11).

А) Подготовка ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объем реакции – 20 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объем реакции. При изменении объема чувствительность метода резко снижается!

Для проведения одной реакции необходимо:

1. ПЦР-буфер – 4 мкл;
2. Праймер-микс – 10 мкл;
3. Образец (исследуемый образец, ПКО или КО-1 и КО-2; ОКО, прошедшего этап выделения ДНК) – 6 мкл.





ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КАЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА

Готовить реакционные пробирки необходимо согласно таблице 5 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1–0,2 мкл для ПЦР;
2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа Эппендорф объемом 1,5–2,0 мл приготовить реакционную смесь: $(N+3) \times 4$ мкл ПЦР-буфера + $(N+3) \times 10$ мкл Праймер-микса, где N – количество исследуемых образцов. Перемешать на вортексе коротким центрифугированием;
3. В каждую пробирку для ПЦР внести по 14 мкл приготовленной реакционной смеси;
4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 6 мкл выделенной ДНК. В пробирки с ПКО и ОКО препарат ДНК не вносится;
5. Внести в соответствующие пробирки ПКО и ОКО;

6. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 сек на микроцентрифуге-вортексе.

Таблица – 5 Схема расположения пробирок для проведения качественного анализа








	Образец 1	Образец N	ПКО	ОКО
Праймер-микс				

ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА

Готовить реакционные пробирки необходимо согласно таблице 6 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1-0,2 мкл для ПЦР;
2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа Эппендорф объемом 1,5 – 2,0 мл приготовить реакционную смесь: $(N+6) \times 4$ мкл ПЦР-буфера + $(N+6) \times 10$ мкл Праймер-микса, где N – количество исследуемых образцов. Перемешать на вортексе коротким центрифугированием;
3. В каждую пробирку для ПЦР внести по 14 мкл приготовленной реакционной смеси;
4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 6 мкл выделенной ДНК. В пробирки с КО-1 и КО-2, ОКО препарат ДНК не вносится;
5. Внести в соответствующие пробирки ОКО, КО1 и КО2;
6. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1-3 сек на микроцентрифуге-вортексе.

Таблица 6 – Схема расположения пробирок для проведения количественного анализа

	Образец 1	Образец N	КО-1	КО-1	КО-2	КО-2	ОКО
Праймер-микс							

Б) ПЦР-амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени

(производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации)

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в «реальном времени». Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой;

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Указать тип анализа – качественный или количественный со стандартами. Протокол ПЦР указан в таблице 7;

3. Указать количество и идентификаторы образцов, стандартов КО-1 и КО-2 с указанием их концентраций, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой;

4. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green и HEX/Yellow;

5. Запустить ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала;

6. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

Таблица 7 – Протокол ПЦР

Стадия	Температура, °С	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	02:00	-	1
2	95	00:15	-	5
	64	00:15		
3	95	00:05		40
	64	00:15	FAM, HEX	

11. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят автоматически во время амплификации с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любой модели пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала детекции на уровне, соответствующем 10–20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t каналов FAM/Green и HEX/Yellow (табл. 1). Учитываются только значения C_t , полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 3 – см. табл. 7).

Сначала оценивают прохождение реакции и значения C_t в контрольных образцах. Интерпретацию результатов в исследуемых образцах начинают только при правильном прохождении ПКО и ОКО.

В случае использования амплификаторов Rotor-Gene Q необходимо активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal).

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (таблица 8).

Таблица 8 – Результаты исследования для ПКО и ОКО

Внесенный материал	Выбранный флуорофор	
	FAM (вирус герпеса человека б типа, HHV6)	HEX (KBM)
ОКО	C_t не указан или > 35	C_t не указан
ПКО	$C_t \leq 32$	$C_t \leq 32$

При получении для отрицательного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 8, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 8, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

При повторном получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 8, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах ДНК

Анализ результатов при проведении качественного анализа представлен в таблице 9.

Таблица – 9 Принцип интерпретации результатов при проведении качественного анализа

Значения Ct		Результат
FAM/Green (HHV6)	HEX/Yellow (KBM)	
Ct ≤ 35	Не учитывается	ДНК вируса герпеса человека 6 типа (HHV6) обнаружена
Ct отсутствует	Ct ≤ 35	ДНК вируса герпеса человека 6 типа (HHV6) не обнаружена
Ct > 35	Не учитывается	Результат на наличие ДНК вируса герпеса человека 6 типа сомнительный
Ct > 35 или отсутствует		Результат невалидный

Анализ результатов при проведении количественного анализа.

Интерпретация результатов проводится автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого вместе с используемым детектирующим амплификатором, или вручную. На основании полученных значений Ct для калибровочных образцов и их концентраций необходимо произвести построение калибровочной прямой. При использовании калибровочной прямой производится вычисление концентраций анализируемых образцов. Для образцов учитываются значения Ct ≤ 35 по каналу FAM. При получении для образцов значения Ct > 35 (при значении Ct у KBM ≤ 35), результат считается сомнительным.

Эффективность ПЦР должна быть в диапазоне 90–110%, разница между значениями Ct у повторов каждого калибровочного образца, КО-1 и КО-2, должна быть не более 1,5. В противном случае необходимо заново провести анализ, начиная с этапа выделения ДНК. В случае, если один из двух дублей КО-1 или КО-2 имеет резко

отклоняющееся от остальных значение St , допускается его игнорирование при построении калибровочной прямой.

Причиной получения невалидного результата может служить присутствие ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала, неверное выполнение протокола анализа, несоблюдение температурного режима ПЦР и др.

Причиной получения сомнительного результата может служить недостаточная концентрация вируса в клиническом образце.

В случае невалидного и сомнительного результата заключение не выдается, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ.

При повторении сомнительного результата повторить исследование набором реагентов другого производителя или другим методом.

Диагностическое значение полученного результата исследования:

Полученный положительный или отрицательный результат анализа может быть использован квалифицированным специалистом (врачом), с учетом данных клинической картины и других видов исследований в совокупности, для ранней диагностики герпесвирусной инфекции у пациентов вне зависимости от формы и стадии заболевания всех групп населения.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

Набор реагентов «ННВ6-тест» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от минус 18 до минус 20 °С в течение всего срока годности набора, допускается хранение при температуре от +2 до +8 °С до 90 суток.

Допускается заморозка/оттаивание набора «ННВ6-тест» не более 10 раз.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов «ННВ6-тест» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Транспортировать при температуре от минус 18 до минус 20 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от +2 до +8 °С до 90 суток, или при температуре от +15 до +25 °С не более 5 суток. Атмосферное давление не контролируется, так как не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными холодоэлементами. Тип, объем и количество холодоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объем термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Срок годности

Срок годности набора реагентов «ННВ6-тест» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от минус 18 до минус 20 °С.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

1 час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями 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».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 170 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» собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета (кроме желтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента

водопроводной водой 1:100 и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Пробирки и упаковка набора реагентов «ННУ6-тест» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

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

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует качество и безопасность набора реагентов «ННУ6-тест» в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования и хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с ограниченной ответственностью «ТестГен»
(ООО «ТестГен»),

432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Приложение А

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2011	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i> .
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Методы испытаний.
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i> .
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального применения.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i> .
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования.