



УТВЕРЖДАЮ
Руководитель отдела сертификации
ООО «ТестГен»
Л. М. Халилова
«27» марта 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ **по применению**

**Набор реагентов для выделения (форма комплектации
2 и 4 набора) и качественного выявления (форма
комплектации 1-4 набора) ДНК Varicella Zoster virus
методом мультиплексной ПЦР-РВ «VZV-test»
по ТУ 21.20.23-069-97638376-2023**

Содержание

Список сокращений	3
Введение.....	4
1. Назначение	7
2. Принцип метода.....	8
3. Состав набора реагентов	10
4. Характеристики набора реагентов	17
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов	35
6. Меры предосторожности при работе с набором реагентов	36
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	38
8. Анализируемые образцы.....	42
9. Подготовка компонентов набора для исследования	50
10. Проведение анализа.....	52
11. Регистрация и интерпретация результатов	63
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов	66
13. Утилизация	70
14. Гарантийные обязательства, контакты.....	71
Приложение А	72
Приложение Б	73

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
VZV	Varicella Zoster virus, вирус ветряной оспы – опоясывающего герпеса
ВКО	внутренний контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
СОП	стандартный образец предприятия
КОЧ	контрольный образец для определения чувствительности
КОС	контрольный образец специфичности
ЛРС	лиофилизированная реакционная смесь

Введение

Целевым анализом, выявляемым при помощи набора реагентов «VZV-test», являются специфичные участки геномной ДНК VZV.

Научная обоснованность выбора целевого анализа заключается в специфичности (уникальности последовательности ДНК) в отношении генома вируса ветряной оспы – опоясывающего герпеса.

Вирус ветряной оспы (синонимы: *Varicella Zoster virus*, VZV, Human alphaherpesvirus 3, HHV-3) – вид ДНК-содержащих вирусов из рода *Varicellovirus* семейства герпесвирусов (*Herpesviridae*). Как и все герпесвирусы, VZV является двуцепочечным ДНК-вирусом и имеет геном размером 125000 п.н., включающий 71 ген.¹

Вирус является возбудителем двух заболеваний – ветряной оспы при первом контакте с вирусом и опоясывающего лишая при реактивации вируса.

Ветряная оспа (Varicella). Заражение VZV происходит главным образом через слизистые оболочки верхних дыхательных путей и носоглотки, возможно заражение через конъюнктиву глаз. Чаще всего протекает как легкое, не требующее специфического лечения заболевание, сопровождающееся лихорадкой, недомоганием, головной болью и зудящей везикулярной сыпью. Пациенты становятся заразными для окружающих за 1–2 дня до появления сыпи, инфицируя контактных при дыхании, и продолжают оставаться заразными в течение последующих 5–7 дней высыпаний, выделяя вирус из кожных везикул.

Наиболее частым осложнением ветряной оспы является бактериальная суперинфекция поврежденной высыпаниями кожи, чаще стафилококковой или стрептококковой этиологии. Реже ветряная оспа осложняется вирусной пневмонией, смертность от

¹ Изучение генетического разнообразия вируса ветряной оспы в отдельных регионах Российской Федерации при помощи высокопроизводительного секвенирования / М. И. Надтока, В. Г. Лысенков, М. Р. Аглетдинов [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2023. – Т. 100, № 5. – С. 267-275.

которой может достигать 10–30 %, особенно среди взрослых с иммунодефицитами и беременных женщин. Самыми частыми неврологическими синдромами при первичной VZV-инфекции являются энцефалит, острая мозжечковая атаксия, миелит и менингит.

У беременных ветряная оспа часто осложняется вирусной пневмонией. При инфицировании VZV на ранних сроках беременности повышается риск развития врожденных пороков у плода. Так, риск развития синдрома врожденной ветряной оспы при первичной VZV-инфекции у матери с 13-й по 20-ю недели беременности составляет 2 %. Данный синдром характеризуется рубцовыми поражениями кожи, гипоплазией конечностей и аномалиями глаз. Считается, что основные поражения при синдроме врожденной ветряной оспы происходят вследствие внутриутробной зостерподобной реактивации VZV. Около 30 % детей, рожденных с синдромом врожденной ветряной оспы, погибают в первые несколько месяцев жизни.

Опоясывающий лишай (herpes zoster). При первичной инфекции VZV попадает в чувствительные ганглии головного и спинного мозга, а также в ганглии вегетативной нервной системы, где пожизненно находится в латентном состоянии, сохраняя способность к реактивации.

В группе риска по реактивации вируса в первую очередь находятся люди старше 60 лет, пациенты, получающие иммуносупрессивную терапию, кортикостероиды, анти-ФНО-терапию, больные раком, СПИД, реципиенты органов и костного мозга после трансплантации.

Заболевание, как правило, проявляется в виде унилатеральной зудящей болезненной сыпи в пределах 1–3 дерматомов, преимущественно грудного отдела. После разрешения высыпаний могут оставаться рубцовые изменения кожи.

Кроме того, существует опасность возникновения склерита, острого эпителиального кератита, увеита, пареза глазодвигательных нервов, ретинита, неврита зрительного нерва, что чревато ухудшением зрения вплоть до наступления слепоты. Обнаружение ДНК вируса в узлах чревного и узлового сплетений вегетативной

нервной системы при реактивации VZV позволяет предполагать возможность поражения висцеральных органов. В ряде случаев, особенно у лиц с иммунодефицитными состояниями, реактивация VZV может вызывать такое генерализованное поражение, как гранулематозный артериит, приводящий к развитию геморрагического инсульта, миелита, менингита и энцефалита.²

Материалом для проведения исследования служат пробы ДНК, выделенные из клинического материала – соскобы с высыпаний, везикулярная жидкость, СМЖ, отделяемое конъюнктивы, плазма периферической крови, плазма пуповинной крови, капиллярная кровь, амниотическая жидкость, слюна, смывы из ротоглотки, мазки из ротоглотки.

Взятие периферической крови и плазма пуповинной крови производится в пробирку с 6 % ЭДТА или 6 % ЭДТА и гелем.

Взятие капиллярной крови производится в пробирку с 6 % ЭДТА.

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний.

Противопоказания к применению не выявлены.

Показания к применению: **ВНИМАНИЕ!** Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования клинического материала, полученного от лиц с подозрением на инфекционные кожные заболевания, герпесвирусную инфекцию вне зависимости от формы и стадии заболевания всех групп населения, для установления диагноза.

Противопоказания к применению отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

² Ветряная оспа и опоясывающий лишай: особенности заболеваемости и клинических проявлений / В. Ф. Лавров, А. С. Казанова, С. Н. Кузин, Д. В. Дубоделов // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2011. – № 3. – С. 54.

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

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «VZV-тест» предназначен для качественного определения специфичного участка геномной ДНК VZV методом мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флюоресцентной детекцией в пробе ДНК, выделенной из клинического материала (соскобы с высыпаний, везикулярная жидкость, СМЖ, отделяемое конъюнктивы, плазма периферической крови, плазма пуповинной крови, капиллярная кровь, амниотическая жидкость, слюна, смывы из ротоглотки, мазки из ротоглотки), полученного от лиц с подозрением на инфекционные кожные заболевания, герпесвирусную инфекцию вне зависимости от формы и стадии заболевания всех групп населения.

Функциональное назначение: полученные результаты могут использоваться для диагностики инфекционных заболеваний, вызванных Varicella Zoster virus (VZV), вне зависимости от формы и стадии заболевания всех групп населения.

Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации в сочетании с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

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 технолог, медицинский лабораторный техник.

2. Принцип метода

Метод

Мультиплексная аллель-специфическая полимеразная цепная реакция в реальном времени с гибридационно-флюоресцентной детекцией.

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения исследования служат пробы ДНК, выделенные из клинического материала: соскобы с высыпаний, везикулярная жидкость, СМЖ, отделяемое конъюнктивы, плазма периферической крови, плазма пуповинной крови, капиллярная кровь, амниотическая жидкость, слюна, смывы из ротоглотки, мазки из ротоглотки.

Взятие периферической крови и плазма пуповинной крови производится в пробирку с 6 % ЭДТА или 6 % ЭДТА и гелем.

Взятие капиллярной крови производится в пробирку с 6 % ЭДТА.

Принцип определения

Качественное выявление ДНК VZV методом мультиплексной ПЦР с детекцией в реальном времени в пробе ДНК включает в себя четыре этапа:

1. Пробоподготовку, выделение ДНК из биоматериала;
2. Подготовку ПЦР-смесей;
3. ПЦР-амплификацию ДНК и гибридационно-флюоресцентную детекцию продуктов амплификации в режиме реального времени;
4. Интерпретацию результатов.

С пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков ДНК при помощи специфичных ним праймеров в реакционном ПЦР-буфере.

В состав ПЦР-буфера входят все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», dNTP, урацил-ДНК-гликозидазу и оптимизированный буфер. Наличие фермента урацил-ДНК-гликозидазы препятствует получению ложноположительных результатов при контаминации продуктами амплификации, при этом фермент полностью инактивируется в

процессе первого цикла денатурации ДНК и не препятствует амплификации продуктов текущей реакции.

В составе праймер-микса присутствуют флюоресцентно-меченные олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются *Taq*-полимеразой, в результате чего разобщаются краситель и тушитель, и происходит нарастание интенсивности флюоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флюоресцентного сигнала в режиме реального времени.

Набор содержит реагенты для мультиплексного определения высокоспецифичного участка ДНК VZV и ДНК, входящей в состав внутреннего контрольного образца (ВКО) (табл. 1). ВКО позволяет оценить эффективность выделения ДНК и возможность наличия ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флюорофору	
FAM/Green	HEX/Yellow
ДНК VZV	ДНК ВКО

Ограничения метода

Возможная причина получения ложноположительного результата – контаминация на этапе выделения ДНК либо проведения реакции мультиплексной 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 набора реагентов. В диагностических целях результаты должны использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования другими тест-системами, применяемой терапией.

Время проведения реакции мультиплексной ПЦР составляет 60 – 80 мин. (без учета пробоподготовки) в зависимости от используемого амплификатора.

3. Состав набора реагентов

Набор реагентов выпускается в четырех формах комплектации:

Форма комплектации 1 «VZV-test» – включает комплект реагентов для постановки ПЦР «VZV-test»;

Форма комплектации 2 «VZV-test-extra» – включает комплект реагентов для постановки ПЦР «VZV-test» и комплект реагентов для выделения ДНК «ДНК-extra-VZV»;

Форма комплектации 3 «VZV-test-Lyo» – включает комплект реагентов для постановки ПЦР «VZV-test-Lyo»;

Форма комплектации 4 «VZV-test-extra-Lyo» – включает комплект реагентов для постановки ПЦР «VZV-test-Lyo» и комплект реагентов для выделения ДНК «ДНК-extra-VZV».

В комплект поставки набора реагентов «VZV-test» входит:

- Набор реагентов (форма комплектации 1, 2, 3 или 4) – 1 шт.,
- Инструкция по применению – 1 шт.,
- Паспорт качества – 1 шт. на партию.

Допустима поставка одной инструкции на несколько совместно поставляемых изделий. Инструкция по применению и паспорт изделия на партию вкладываются в транспортную упаковку.

Количество анализируемых проб

Для всех форм комплектации – набор реагентов рассчитан на 96 реакций, что соответствует определению 94 исследуемых образцов, отрицательных и положительных образцов при единичном запуске амплификатора на 96 лунок или 32 единичным постановкам

исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Таблица 2 – Состав набора реагентов форма комплектации 1 – «VZV-test»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1	ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2	Праймер-микс	Прозрачная жидкость с розоватым оттенком	1 пробирка, 480 мкл
3	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 960 мкл
4	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
5	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1800 мкл

Таблица 3 – Состав набора реагентов форма комплектации 2 – «VZV-test-extra»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
Комплект реагентов для постановки ПЦР «VZV-test»			
1	ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2	Праймер-микс	Прозрачная жидкость с розоватым оттенком	1 пробирка, 480 мкл
3	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 960 мкл
4	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
5	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1800 мкл
Комплект реагентов для выделения ДНК «ДНК-extra-VZV»			
1	Буфер для связывания	Прозрачная бесцветная жидкость, допускается желтый оттенок	1 флакон (48 мл)
2	Магнитные частицы	Коричневая суспензия	1 пробирка, (960 мкл)

3	Раствор для промывки №1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон (68 мл)
4	Раствор для промывки №2	Прозрачная бесцветная жидкость	2 флакона (по 68 мл)
5	Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон (21 мл)

Таблица 4 – Состав набора реагентов форма комплектации 3 – «VZV-test-Lyo»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1	ЛРС	Сухая аморфная пористая масса белого или светло-розового цвета	96 пробирок, объединенных «мостиками» в планшет
2	ПКО	Сухая аморфная пористая масса белого цвета	1 флакон (лиофилизат)
3	ВКО	Сухая аморфная пористая масса белого цвета	1 флакон (лиофилизат)
4	Раствор для восстановления ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 704 мкл
5	Раствор для восстановления ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 960 мкл
6	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, 1800 мкл
7.	Пленка для заклеивания ПЦР-планшета	Прозрачная пленка, предназначенная для герметизации ПЦР-планшетов и предотвращения потери образца во время амплификации	2 шт.

Таблица 5 – Состав набора реагентов форма комплектации 4 – «VZV-test-extra-Lyo»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
Комплект реагентов для постановки ПЦР «VZV-test-Lyo»			
1	ЛРС	Сухая аморфная пористая масса белого или светло-розового цвета	96 пробирок, объединенных «мостиками» в планшет
2	ПКО	Сухая аморфная пористая масса белого цвета	1 флакон (лиофилизат)
3	ВКО	Сухая аморфная пористая масса белого цвета	1 флакон (лиофилизат)
4	Раствор для восстановления ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 704 мкл
5	Раствор для восстановления ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 960 мкл
6	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, 1800 мкл
7.	Пленка для заклеивания ПЦР-планшета	Прозрачная пленка, предназначенная для герметизации ПЦР-планшетов и предотвращения потери образца во время амплификации	2 шт.
Комплект реагентов для выделения ДНК «ДНК-extra-VZV»			
1	Буфер для связывания	Прозрачная бесцветная жидкость, допускается желтый оттенок	1 флакон (48 мл)
2	Магнитные частицы	Коричневая суспензия	1 пробирка, (960 мкл)
3	Раствор для промывки № 1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон (68 мл)
4	Раствор для промывки № 2	Прозрачная бесцветная жидкость	2 флакона (по 68 мл)
5	Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон (21 мл)

Описание компонентов комплекта реагентов для постановки ПЦР «VZV-test»

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

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

1. Праймеры и зонд к специфичному участку геномной ДНК VZV. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.

2. Праймеры и зонд ВКО. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Внутренний контрольный образец (ВКО) готов к использованию и представляет собой плазмидную ДНК с синтетической вставкой специфичного фрагмента ДНК ВКО.

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК, содержащих синтетические вставки амплифицируемых фрагментов геномной ДНК Varicella Zoster virus и ДНК внутреннего контрольного образца ВКО.

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

Описание компонентов комплекта реагентов для постановки ПЦР «VZV-test-Lyo»

Лиофилизированная реакционная смесь (ЛРС) представляет собой лиофилизированно высушенный буфер, который содержит все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты (включая dUTP), урацил-ДНК-гликозилазу (UDG), оптимизированный буфер и смесь криопротекторов. Также данная смесь содержит праймеры и зонды, предназначенные для выявления специфических мишеней – см. таблицу 1.

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой лиофилизированную смесь плазмидных ДНК, содержащих синтетические вставки амплифицируемых фрагментов геномной ДНК Varicella Zoster virus и ДНК внутреннего контрольного образца ВКО.

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

Внутренний контрольный образец (ВКО) готов к использованию и представляет собой лиофилизированный препарат плазмидной ДНК с синтетической вставкой специфичного фрагмента ДНК ВКО.

Раствор для восстановления ПКО представляет собой деионизованную воду, свободную от ДНКаз и РНКаз.

Раствор для восстановления ВКО представляет собой деионизованную воду, свободную от ДНКаз и РНКаз.

Описание компонентов комплекта реагентов для выделения ДНК «ДНК-extra-VZV»

Буфер для связывания готов к использованию и включает в состав компоненты для лизирования биоматериала и связывания ДНК с поверхностью магнитных частиц.

Раствор магнитных частиц: готов к использованию и представляет собой суспензию магнитных частиц.

Раствор для промывки № 1 готов к использованию и включает в состав компоненты для промывки ДНК от остатков биоматериала.

Раствор для промывки № 2 готов к использованию и включает в состав компоненты для отмывки остатков биоматериала и раствора для промывки № 1.

Элюент готов к использованию и включает в состав компоненты для десорбции очищенных ДНК с поверхности магнитных частиц.

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 6 – Характеристики набора реагентов «VZV-test»
форма комплектации 1 – «VZV-test»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
Комплект реагентов для постановки ПЦР «VZV-тест»	
1. Технические характеристики	
1.1. Внешний вид	
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость
Праймер-микс	Прозрачная жидкость с розоватым оттенком
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 1.5 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 1.6 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
2. Функциональные характеристики	
Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флюоресценции в пробирке с ПКО по каналу FAM Ct ≤ 28 и по каналу HEX Ct ≤ 28
Отрицательный результат с ОКО	В пробирке с ОКО по каналу FAM и HEX Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует) или Ct ≥ 35
Прохождение реакции с ВКО	Регистрация роста сигнала флюоресценции в пробирках с ВКО по каналу FAM Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует) и по каналу HEX Ct ≤ 28
Прохождение реакции с СОП-КОС	В пробирке с СОП-КОС по каналу FAM и HEX Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует)
Прохождение реакции с СОП-КОЧ	В пробирках с СОП-КОЧ во всех повторях (не менее 4) по каналу FAM Ct ≤ 35 , по каналу HEX Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует) или Ct ≥ 35

Таблица 7 – Характеристики набора реагентов «VZV-test» форма комплектации 2 – «VZV-test-extra»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
Комплект реагентов для постановки ПЦР «VZV-test»	
1. Технические характеристики	
1.1. Внешний вид	
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость
Праймер-микс	Прозрачная жидкость с розоватым оттенком
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 1.5 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 1.6 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
2. Функциональные характеристики	
Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флюоресценции в пробирке с ПКО по каналу FAM Ct ≤ 28 и по каналу HEX Ct ≤ 28
Отрицательный результат с ОКО	В пробирке с ОКО по каналу FAM и HEX Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует) или Ct ≥ 35
Прохождение реакции с ВКО	Регистрация роста сигнала флюоресценции в пробирках с ВКО по каналу FAM Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует) и по каналу HEX Ct ≤ 28
Прохождение реакции с СОП-КОС	В пробирке с СОП-КОС по каналу FAM и HEX Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует)
Прохождение реакции с СОП-КОЧ	В пробирках с СОП-КОЧ во всех повторях (не менее 4) по каналу FAM Ct ≤ 35 , по каналу HEX Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует) или Ct ≥ 35

Продолжение таблицы 7

Наименование показателя	Характеристики и нормы
Комплект реагентов для выделения ДНК «ДНК-extra-VZV»	
1. Технические характеристики	
1.1. Внешний вид	
Буфер для связывания	Прозрачная бесцветная жидкость, допускается желтый оттенок
Магнитные частицы, МЧ	Коричневая суспензия
Раствор для промывки № 1	Прозрачная бесцветная жидкость
Раствор для промывки № 2	Прозрачная бесцветная жидкость
Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость
1.2. Физико-химические показатели	
Показатели концентрации ионов водорода, рН	
Буфер для связывания	min 7,0 рН, max 9,0 рН
Раствор для промывки № 1	min 6,0 рН, max 8,0 рН
Раствор для промывки № 2	min 6,0 рН, max 8,0 рН
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 1.5 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 1.6 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
2. Функциональные характеристики	
2.2 Отсутствие контаминации компонентов набора посторонними ДНК/РНК	Отрицательный результат с ОКО в контрольной ПЦР по каналам FAM и HEX
2.3. Пригодность ДНК для ПЦР	При тестировании контрольного образца выделения (КВ), прошедшего этап выделения ДНК с помощью комплекта «ДНК-Экстра-VZV», по каналам FAM и Ct не более 30 цикла и значение ΔCt между выходом КВ, прошедшим выделение, и КВ без выделения по каналам FAM не более 2 циклов (во всех дублях)

Таблица 8 – Характеристики набора реагентов «VZV-test» форма комплектации 3 – «VZV-test-Lyo»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
Комплект реагентов для постановки ПЦР «VZV-test-Lyo»	
1. Технические характеристики	
1.1. Внешний вид	
ЛРС	Сухая аморфная пористая масса белого или светло-розового цвета
ПКО	Сухая аморфная пористая масса белого цвета
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ВКО	Сухая аморфная пористая масса белого цвета
Раствор для восстановления ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
Раствор для восстановления ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость
Пленка для заклеивания ПЦР-планшета	Прозрачная пленка, предназначенная для герметизации ПЦР-планшетов и предотвращения потери образца во время амплификации
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 1.5 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 1.6 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
2. Функциональные характеристики	
Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флюоресценции в пробирке с ПКО по каналу FAM Ct \leq 28 и по каналу HEX Ct \leq 28
Отрицательный результат с ОКО	В пробирке с ОКО по каналу FAM и HEX Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует) или Ct \geq 35
Прохождение реакции с ВКО	Регистрация роста сигнала флюоресценции в пробирках с ВКО по каналу FAM Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует) и по каналу HEX Ct \leq 28
Прохождение реакции с СОП-КОС	В пробирке с СОП-КОС по каналу FAM и HEX Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует)
Прохождение реакции с СОП-КОЧ	В пробирках с СОП-КОЧ во всех повторях (не менее 4) по каналу FAM Ct \leq 35, по каналу HEX Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует) или Ct \geq 35

Таблица 9 – Характеристики набора реагентов «VZV-test» форма комплектации 4 – «VZV-test-extra-Lyo»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
Комплект реагентов для постановки ПЦР «VZV-test-Lyo»	
1. Технические характеристики	
1.1. Внешний вид	
ЛРС	Сухая аморфная пористая масса белого или светло-розового цвета
ПКО	Сухая аморфная пористая масса белого цвета
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ВКО	Сухая аморфная пористая масса белого цвета
Раствор для восстановления ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
Раствор для восстановления ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость
Пленка для заклеивания ПЦР-планшета	Прозрачная пленка, предназначенная для герметизации ПЦР-планшетов и предотвращения потери образца во время амплификации
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 1.5 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 1.6 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
2. Функциональные характеристики	
Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флюоресценции в пробирке с ПКО по каналу FAM Ct ≤ 28 и по каналу HEX Ct ≤ 28
Отрицательный результат с ОКО	В пробирке с ОКО по каналу FAM и HEX Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует) или Ct ≥ 35
Прохождение реакции с ВКО	Регистрация роста сигнала флюоресценции в пробирках с ВКО по каналу FAM Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует) и по каналу HEX Ct ≤ 28
Прохождение реакции с СОП-КОС	В пробирке с СОП-КОС по каналу FAM и HEX Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует)
Прохождение реакции с СОП-КОЧ	В пробирках с СОП-КОЧ во всех повторях (не менее 4) по каналу FAM Ct ≤ 35 , по каналу HEX Ct не указан (то есть график накопления флюоресценции отсутствует) или Ct ≥ 35

Продолжение таблицы 9

Наименование показателя	Характеристики и нормы
Комплект реагентов для выделения ДНК «ДНК-extra-VZV»	
1. Технические характеристики	
1.1. Внешний вид	
Буфер для связывания	Прозрачная бесцветная жидкость, допускается желтый оттенок
Магнитные частицы, МЧ	Коричневая суспензия
Раствор для промывки № 1	Прозрачная бесцветная жидкость
Раствор для промывки № 2	Прозрачная бесцветная жидкость
Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость
Наименование показателя	Характеристики и нормы
1.2. Физико-химические показатели	
Показатели концентрации ионов водорода, рН	
Буфер для связывания	min 7,0 рН, max 9,0 рН
Раствор для промывки № 1	min 6,0 рН, max 8,0 рН
Раствор для промывки № 2	min 6,0 рН, max 8,0 рН
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 1.5 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 1.6 ТУ 21.20.23-069-97638376-2023
2. Функциональные характеристики	
2.2. Отсутствие контаминации компонентов набора посторонними ДНК	Отрицательный результат с ОКО в контрольной ПЦР по каналу FAM
2.3. Пригодность ДНК для ПЦР	При тестировании контрольного образца выделения (КВ), прошедшего этап выделения ДНК с помощью комплекта «ДНК-Экстра-VZV», по каналам FAM Ct не более 30 цикла и значение Δ Ct между выходом КВ, прошедшим выделение, и КВ без выделения по каналу FAM не более 2 циклов (во всех дублях).

Примечание: контрольная ПЦР проводится с использованием стандартного образца предприятия набора «СОП-Экстра-VZV».

При проведении контрольной ПЦР в качестве отрицательного контрольного образца (ОКО), входящего в состав набора «СОП-Экстра-VZV», используют деионизованную воду, свободную от ДНКаз/РНКаз.

В качестве контрольного образца выделения (КВ), входящего в состав набора «СОП-Экстра-VZV», используют раствор плазмидной ДНК, содержащий специфический фрагмент геномной ДНК человека.

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 чувствительность

Специфичен по отношению к ДНК *Varicella Zoster virus*.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК: *Human alphaherpesvirus 1*, *Human alphaherpesvirus 2*, *Epstein-Barr virus*, *Cytomegalovirus*, *Human betaherpesvirus 6A*, *Human betaherpesvirus 6B*, *Measles morbillivirus*, *Rubella virus*, *Streptococcus anginosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Toxoplasma gondii*.

4.2.2. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «VZV-test» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «VZV-test», 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 – в данном случае, загрязнение клинического образца гемоглобином крови может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения ДНК.

Исследованные концентрации интерферирующих веществ приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Анализ результатов проведенного исследования.

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества	
Гемоглобин	100 мг/мл
Муцин	2,3 мг/мл
Экзогенные интерферирующие вещества	
Препараты лечебно-профилактического назначения	
Хлоргексидин	0,05 г/мл
Мирамистин (бензилдиметил[3 (миристоиламино) пропил]аммония хлорида моногидрат)	0,1 мкг/мл

На основании результатов исследования данные вещества не оказывают интерферирующего воздействия на работу набора и не приводят к ингибированию ПЦР при концентрациях, не превышающих допустимые.

Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия клинического материала.

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.

4.2.3. Аналитическая чувствительность: предел обнаружения (LOD)

В соответствии ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом международных рекомендаций CLSI EP-17A2 предел обнаружения (LOD) определяли методом анализа разведений Международного стандарта ВОЗ в диапазоне предполагаемого предела обнаружения: 100, 150, 250, 300, 350, 450, 500 копий/мл (2,10; 2,27; 2,49; 2,57; 2,64; 2,75; 2,80 log₁₀ МЕ/мл) и 100, 250, 350, 500, 600, 850, 1000 копий/мл (2,10; 2,50; 2,64; 2,80; 2,91; 3,03; 3,10 log₁₀ МЕ/мл):

- Международный стандарт ВОЗ 1-й международный стандарт ВОЗ для анализов VZV NAT Код NIBSC: 19/164.

На основании рассмотрения ECBS отчета об исследовании WHO/BS/ 2021.2405 19/164 был установлен в качестве первого международного стандарта ВОЗ для ДНК вируса ветряной оспы для анализов на основе NAT с назначенной единицей измерения 7,0 log₁₀ МЕ/флакон (6,8 log₁₀ копий/мл).

Для качественного выявления ДНК Varicella-Zoster virus был использован набор реагентов, зарегистрированный в установленном порядке, «Набор реагентов для выявления ДНК Varicella-Zoster virus (VZV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® VZV-FL"» по ТУ 9398-183-01897593-2011 (ПУ ФСР № 2012/13619 от 27.03.2019)

Концентрацию ДНК Varicella Zoster virus в исследуемых образцах устанавливали с помощью цифровой капельной ПЦР с использованием Система для проведения капельной цифровой ПЦР Bio-Rad QX200 (ПУ № РЗН 2022/17351).

По результатам исследования набора реагентов «VZV-test» предел обнаружения ДНК Varicella Zoster virus в образцах с частотой выявления 95 % для каждого амплификатора составляет:

Таблица 11 – Предел обнаружения ДНК Varicella Zoster virus в образцах

Форма комплекта ции (ФК) набора реагентов «VZV-test»	Набор реагентов для выделения ДНК	Используемый амплификатор	Концентрация ДНК VZV, МЕ/мл (LOD) с доверительной вероятностью 95 %	Доверительный интервал с доверительной вероятностью 95 %
ФК 1 - «VZV-test»	«ДНК-Фаст»	ДТпрайм	1093,22	1087,85-1098,59
		CFX 96	1174,78	1169,41-1180,15
		Rotor-Gene Q	1247,21	1241,84-1252,58
		QuantStudio 5	1155,85	1150,48-1161,22
		FLUORITE	1293,62	1288,25-1298,99
	«НК-Экстра»	ДТпрайм	574,24	568,87-579,61
		CFX 96	562,40	557,03-567,77
		Rotor-Gene Q	554,39	549,02-559,76
		QuantStudio 5	567,47	562,10-572,84
		FLUORITE	539,94	534,57-545,31
ФК 2 - «VZV-test-extra»	«ДНК-extra-VZV», входящий в состав ФК 2 набора реагентов «VZV-test»	ДТпрайм	558,80	553,43-564,17
		CFX 96	578,06	572,69-583,43
		Rotor-Gene Q	550,20	544,83-555,57
		QuantStudio 5	555,46	550,09-560,83
		FLUORITE	616,37	611,00-621,74
ФК 3 - «VZV-test-Lyo»	«ДНК-Фаст»	ДТпрайм	1104,97	1099,60-1110,34
		CFX 96	1262,14	1256,77-1267,51
		Rotor-Gene Q	1154,22	1148,85-1159,59
		QuantStudio 5	1020,39	1015,02-1025,76
		FLUORITE	1116,87	1111,50-1122,24
	«НК-Экстра»	ДТпрайм	604,78	599,41-610,15
		CFX 96	562,05	556,68-567,42
		Rotor-Gene Q	625,19	619,82-630,56
		QuantStudio 5	545,05	539,68-550,42
		FLUORITE	571,55	566,18-576,92
ФК 4 - «VZV-test-extra-Lyo»	«ДНК-extra-VZV», входящий в состав ФК 4 набора реагентов «VZV-test»	ДТпрайм	627,87	622,50-633,24
		CFX 96	622,48	617,11-627,85
		Rotor-Gene Q	573,46	568,09-578,83
		QuantStudio 5	551,20	545,83-556,57
		FLUORITE	605,55	600,18-610,92

4.2.4. Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости положительный контрольный образец, внутренний контрольный образец по 10 повторов.

Данные по повторяемости получают внутри лаборатории для конкретного оборудования и внутри конкретной партии набора реагентов.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости рассчитывают среднее арифметическое выборки, дисперсию, среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации по полученным значениям в повторах контрольных образцов.

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 3 %.

4.2.5. Прецизионность в условиях воспроизводимости

Оценку воспроизводимости тест-системы проводят аналогично расчету прецизионности в условиях повторяемости (раздел 4.2.3.), однако для тестирования используют различные партии набора реагентов, реакции ставят в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах (Блок воспроизводимости 1, Блок воспроизводимости 2, Блок воспроизводимости 3, Блок воспроизводимости 4).

При проведении прецизионности в условиях воспроизводимости наблюдалась полная внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 5 %.

4.2.6. Метрологическая прослеживаемость

Метрологическая прослеживаемость калибровки и приписанное значение калибраторов конечного пользователя – ПКО, входящего в состав набора реагентов «VZV-test», и рабочих калибраторов СОП-КОЧ, СОП-КОС в соответствии с ГОСТ Р ИСО 17511–2022.

Иерархия калибровки ПКО, СОП-КОЧ проведена с международным общепринятым калибратором, определяющим измеряемую величину (п. 5.5 ГОСТ Р ИСО 17511–2022):

- Международный стандарт ВОЗ 1-й международный стандарт ВОЗ для анализов VZV NAT Код NIBSC: 19/164.

Общая иерархия калибровки с указанием неопределенности измерений на каждом этапе представлена в таблицах 12 и 13.

Таблица 12 – Результаты иерархии калибровки

Аналит	ДНК VZV		
Тип образца	Международный общепринятый калибратор	Рабочий калибратор	Калибратор МИ IVD конечного пользователя
Образец	Международный стандарт ВОЗ 1-й международный стандарт ВОЗ для анализов VZV NAT Код NIBSC: 19/164	СОП-КОЧ	ПКО
Неопределенность измерений	$u_{m.3} = 0,36$	$u_{m.3} = 0,36$	$u_{p.5} = 0,06$ $u_{cal} = 0,37$

Таблица 13 – Суммарная стандартная неопределенность и расширенная суммарная неопределенность

Суммарная стандартная неопределенность		Расширенная суммарная неопределенность	
$u(y) = 0,48$	соскобы с высыпаний	$U(y) = 0,96$	соскобы с высыпаний
$u(y) = 0,54$	везикулярная жидкость	$U(y) = 1,08$	везикулярная жидкость
$u(y) = 0,43$	СМЖ	$U(y) = 0,86$	СМЖ
$u(y) = 0,43$	отделяемое конъюнктивы	$U(y) = 0,86$	отделяемое конъюнктивы
$u(y) = 0,41$	плазма периферической крови	$U(y) = 0,82$	плазма периферической крови
$u(y) = 0,52$	плазма пуповинной крови	$U(y) = 1,04$	плазма пуповинной крови
$u(y) = 0,47$	капиллярная кровь	$U(y) = 0,94$	капиллярная кровь
$u(y) = 0,49$	амниотическая жидкость	$U(y) = 0,98$	амниотическая жидкость
$u(y) = 0,51$	слюна	$U(y) = 1,02$	слюна
$u(y) = 0,51$	смывы из ротоглотки	$U(y) = 1,02$	смывы из ротоглотки
$u(y) = 0,49$	мазки из ротоглотки	$U(y) = 0,98$	мазки из ротоглотки

Приписанная концентрация калибратора конечного пользователя ПКО составляет 8×10^5 копий/мл, рабочих калибраторов СОП-КОЧ составляет 500 копий/мл.

В соответствии с п. 4.7.1 с) ГОСТ Р ИСО 17511—2022 суммарная стандартная неопределенность измерения значения, присвоенного калибратором МИ IVD конечного пользователя (ПКО) u_{cal} не превышает допустимую долю $U_{max}(y)$ спецификации для МИ IVD с учетом коэффициента охвата k ($k = 2$, для уровня достоверности приблизительно 95 %):

Таблица 14 – Оценка суммарной стандартной неопределенности измерений

Оценка суммарной стандартной неопределенности измерений набора реагентов «VZV-test» по отношению к ДНК VZV	Клинический материал
$u_{cal} = 0,96 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	соскобы с высыпаний
$u_{cal} = 1,08 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	везикулярная жидкость
$u_{cal} = 0,86 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	СМЖ
$u_{cal} = 0,86 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	отделяемое конъюнктивы
$u_{cal} = 0,82 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	плазма периферической крови
$u_{cal} = 1,04 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	плазма пуповинной крови
$u_{cal} = 0,94 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	капиллярная кровь
$u_{cal} = 0,98 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	амниотическая жидкость
$u_{cal} = 1,02 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	слюна
$u_{cal} = 1,02 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	смывы из ротоглотки
$u_{cal} = 0,98 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	мазки из ротоглотки

И в соответствии с п. 4.1 с) ГОСТ Р ИСО 17511–2022 оцененная суммарная расширенная неопределенность измерений $U(y)$ не превышает максимально допустимую неопределенность измерения $U_{max}(y)$:

Таблица 15 – Оценка суммарной расширенной неопределенности измерений.

Оценка суммарной расширенной неопределенности измерений набора реагентов «VZV-test» по отношению к ДНК VZV	Клинический материал
$U(y)=0,96 \leq U_{max}(y)=2$	соскобы с высыпаний
$U(y)=1,08 \leq U_{max}(y)=2$	везикулярная жидкость
$U(y)=0,86 \leq U_{max}(y)=2$	СМЖ
$U(y)=0,86 \leq U_{max}(y)=2$	отделяемое конъюнктивы
$U(y)=0,82 \leq U_{max}(y)=2$	плазма периферической крови
$U(y)=1,04 \leq U_{max}(y)=2$	плазма пуповинной крови
$U(y)=0,94 \leq U_{max}(y)=2$	капиллярная кровь
$U(y)=0,98 \leq U_{max}(y)=2$	амниотическая жидкость
$U(y)=1,02 \leq U_{max}(y)=2$	слюна
$U(y)=1,02 \leq U_{max}(y)=2$	смывы из ротоглотки
$U(y)=0,98 \leq U_{max}(y)=2$	мазки из ротоглотки

Иерархия калибровки СОП-КОС проведена с первичной РМИзм, определяющей измеряемую величину (п. 5.3 ГОСТ Р ИСО 17511–2022).

Общая иерархия калибровки с указанием неопределенности измерений на каждом этапе представлена в таблице 16.

Таблица 16 – Общая иерархия калибровки

Аналит	геномная ДНК человека, выделенная из клеточной линии U937	
Образец	Вторичный СО - геномная ДНК человека, выделенная из клеточной линии U937 (производства ООО “СибЭнзайм”, Россия)	СОП-КОС
Тип образца	Вторичный СО	Рабочий калибратор
Неопределенность измерений	$u_{m.3} = 0,78$	$u_{p.4} = 0,1$
Суммарная стандартная неопределенность	$u(y) = 0,78$	
Расширенная суммарная неопределенность	$U(y) = 1,56$	

Приписанная концентрация рабочего калибратора **СОП-КОС** составляет 1000 копий/мкл.

4.3. Характеристики клинической эффективности

Для проведения клинических испытаний было использовано 140 образцов клинического материала (соскобы с высыпаний – 16, везикулярная жидкость – 17, СМЖ - 4, отделяемое конъюнктивы – 15, плазма периферической крови - 20, плазма пуповинной крови – 4, капиллярная кровь – 17, амниотическая жидкость – 4, слюна – 14, смывы из ротоглотки – 14, мазки из ротоглотки – 15), от пациентов с подозрением на наличие инфекционных заболеваний, вызванных вирусом ветряной оспы – опоясывающего герпеса (VZV), которые были получены из банка остаточных аликвот, сформированного в процессе рутинной лечебно-диагностической практики.

Такое количество образцов было набрано в соответствии с рекомендациями ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом рекомендаций Международного руководства CLSI EP09-A3.

Каждый исследуемый клинический образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «VZV-test» и полученные данные сравнивались с результатами, полученными ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России с помощью зарегистрированных медицинских изделий:

- «Набор реагентов для выявления ДНК Varicella-Zoster virus (VZV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® VZV-FL" по ТУ 9398-183-01897593-2011», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13619 от 27.03.2019;

- «Набор реагентов для выявления ДНК Varicella-zoster virus (VZV) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме "реального времени" "АмплиПрайм® VZV" по ТУ 21.20.23-170-09286667-2022», производства ООО «НекстБио», Россия, регистрационное удостоверение № РЗН 2023/20041 от 10.04.2023.

Свидетельством правильности работы исследуемого медицинского изделия было совпадение результатов.

Для проведения ПЦР-исследования набором реагентов «VZV-test» формами комплектации 1 и 2 использовали

амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/10229 от 03.03.2011);

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

- Амплификатор детектирующий QuantStudio 5, Thermo Fisher Scientific, США (Регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019);

- Амплификатор детектирующий CFX96, BioRad, США (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016);

- Амплификатор FLUORITE, Xian TianLong Science and Technology Co, Китай (Регистрационное удостоверение № РЗН 2022/16415 от 04.04.2024).

Для проведения ПЦР-исследования набором реагентов «VZV-test» формами комплектации 3 и 4 использовали амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/10229 от 03.03.2011);

- Амплификатор детектирующий QuantStudio 5, Thermo Fisher Scientific, США (Регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019);

- Амплификатор детектирующий CFX96, BioRad, США (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016);

- Амплификатор FLUORITE, Xian TianLong Science and Technology Co, Китай (Регистрационное удостоверение № РЗН 2022/16415 от 04.04.2024).

Воспроизводимость результатов для всех использованных амплификаторов 100 %.

Доверительные интервалы (ДИ) диагностических характеристик были рассчитаны по методу Клоппера и Пирсона (Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper, C., & Pearson, E. (1934).

The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial. *Biometrika*, 26(4), 404-413. doi:10.2307/2331986).
 Диагностические характеристики испытуемого набора были рассчитаны с доверительной вероятностью 95 %.

Таблица 17 – Результаты изучения диагностических характеристик по образцам клинического материала

Вид исследуемого материала	Кол-во наблюдений с положительными пробами	Кол-во наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
соскобы с высыпаний	32	248	100% (95% ДИ:89,11%-100%)	100% (95% ДИ:98,52%-100%)
везикулярная жидкость	34	246	100% (95% ДИ:89,72%-100%)	100% (95% ДИ:98,51%-100%)
СМЖ	8	272	100% (95% ДИ:63,06%-100%)	100% (95% ДИ:98,65%-100%)
отделяемое конъюнктивы	30	250	100% (95% ДИ:88,43%-100%)	100% (95% ДИ:98,54%-100%)
плазма периферической крови	40	240	100% (95% ДИ:91,19%-100%)	100% (95% ДИ:98,47%-100%)
плазма пуповинной крови	8	272	100% (95% ДИ:63,06%-100%)	100% (95% ДИ:98,65%-100%)
капиллярная кровь	34	246	100% (95% ДИ:89,72%-100%)	100% (95% ДИ:98,51%-100%)
Амниотическая жидкость	8	272	100% (95% ДИ:63,06%-100%)	100% (95% ДИ:98,65%-100%)
слюна	28	252	100% (95% ДИ:87,66%-100%)	100% (95% ДИ:98,55%-100%)
смывы из ротоглотки	28	252	100% (95% ДИ:87,66%-100%)	100% (95% ДИ:98,55%-100%)
мазки из ротоглотки	30	250	100% (95% ДИ:88,43%-100%)	100% (95% ДИ:98,54%-100%)

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. проведение анализа с использованием пробы ДНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);

3. загрязнение клинического материала ингибирующими веществами в концентрациях, превышающих допустимые;

4. контаминация реакционных смесей с образцами исследуемой ДНК содержащим из пробирки ПКО или продуктами ПЦР;

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 «Набор реагентов для выделения (форма комплектации 2 и 4 набора) и качественного выявления (форма комплектации 1-4 набора) ДНК *Varicella Zoster virus* методом мультиплексной ПЦР-РВ «VZV-test» по ТУ 21.20.23-069-97638376-2023» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором реагентов

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.

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «VZV-test», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «VZV-test» во всех формах комплектации, обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «VZV-test», 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».

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 от 28.01.2021 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, МУ 1.3.2569-09.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

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.

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

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

- не использовать набор по истечении срока годности;

- избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

Работа с Комплектом реагентов для выделения ДНК «ДНК-extra-VZV» осуществляется в рабочей зоне 2 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Работа с Комплектом реагентов для постановки ПЦР «VZV-test» и «VZV-test-extra-Lyo» осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Необходимое оборудование для выделения ДНК (формы комплектации 2 и 4):

1. Стерильный ламинарный бокс биологической (микробиологической) безопасности II класс;
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл, поддерживающий температуру от 25 до 100 °С;
3. Микроцентрифуга-вортекс для пробирок типа «Эппендорф» 1,5 мл;
4. Центрифуга для микропробирок, с RCF не ниже 16 000 g;
5. Дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
6. Холодильник от 2 до 8 °С,
7. Морозильная камера от -40 до -2 °С;

Дополнительное оборудование для выделения ДНК (формы комплектации 2 и 4):

1. Процессор магнитных частиц для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков KingFisher Flex, производства Thermo Fisher Scientific, Финляндия, РУ № ФСЗ 2009/05562 от 16.03.2022;
2. Пипетирующая станция пробоподготовки Tecan серии Freedom EVO®, TECAN, Швейцария, РУ № ФСЗ 2008/03047 от 04.07.2016;
3. Для внесения реагентов в глубоколоночные планшеты 96DW для могут быть использованы многоканальные автоматические дозаторы переменного объема (например, «Eppendorf», Германия) или пипетирующая станция

пробоподготовки (Tecan серии Freedom EVO®, TECAN, Швейцария, Австрия или аналогичная),

4. Электрический лабораторный аспиратор с колбой-ловушкой.

Необходимое оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты (например, Боксы микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С» по ТУ 32.50.50-010-51495026-2020, производства ЗАО «Ламинарные системы», РУ № ФСР 2012/13259 от 29.07.2021 или Бокс для стерильных работ DNA/RNA UV-Cleaner Box UVC/T-M-AR, Biosan, Латвия, РУ № РЗН 2023/19369 от 18.01.2023);

2. Вортекс (например, Высокоскоростная мини-центрифуга Microspin 12, BIOSAN SIA, Латвия, РУ № ФСЗ 2011/10116 от 11.07.2011 или центрифуга-встряхиватель CM-70M, производства SIA «ELMI», Латвия, РУ № РЗН 2016/4616 от 31.05.2023);

3. Центрифуга для ПЦР планшетов (например, Центрифуга лабораторная с охлаждением LMC-4200R, BIOSAN SIA, Латвия, РУ № ФСЗ 2011/10117);

4. Дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5-10 мкл, 10-100 мкл или 20-200 мкл, 100-1000 мкл (например, Eppendorf Research Plus, Германия, РУ № ФСЗ 2011/11028 от 15.11.2011 или «Biohit», Финляндия, РУ № ФСЗ 2012/12201 от 18.05.2012);

5. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше -16 °С (например, Холодильник комбинированный лабораторный ХЛ-250 «POZIS», ХЛ-250-1 «POZIS» по ТУ 9452-203-07503307-2012, производства АО «ПОЗИС», РУ № РЗН 2016/4043 от 03.06.2024);

6. Амплификатор³ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red:

³ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя.

- 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),
- QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США, РУ № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019),
- FLUORITE (Xian TianLong Science and Technology Co, Китай, РУ № РЗН 2022/16415 от 04.04.2024).

Для формы комплектации 1-2 возможно проведение анализа с использованием детектирующего амплификатора Rotor-Gene-Q, «Qiagen», Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010).

ВНИМАНИЕ! Формы комплектации 3 и 4 необходимо использовать совместно с приборами планшетного типа.

Необходимые 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 (например, «Axugen», США); при использовании аспиратора с колбой-ловушкой одноразовые наконечники до 1000 мкл без аэрозольного барьера (например, «Axugen», США);

2. Одноразовые пробирки Эппендорф на 1,5 мл;

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

- пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл,

- пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл в стрипах,

- планшеты для ПЦР с оптически прозрачной пленкой (например, «Axugen», США);

4. Халат и одноразовые перчатки без талька;

5. Емкость с дезинфицирующим раствором;

Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,1-0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия);

7. Для проведения процедуры выделения ДНК – штатив для пробирок 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

8. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл;

9. Для формы комплектации 1 и 3 – Набор для выделения ДНК (см. п. 8.2 Инструкции)

Дополнительные материалы, не входящие в состав изделия

1. Глубоколуночные планшеты 96DW объемом 2200 мкл, свободные от посторонней ДНК/РНК и ДНКаз/РНКаз (РУ № ФСЗ 2009/05562 от 16.03.2022);

2. Гребенка наконечников для магнитов 96 под формат планшета 96DW-tip (РУ № ФСЗ 2009/05562 от 16.03.2022)

3. Ванночки-резервуары на 100 мл (например, Biologix, Китай)

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения исследования служат пробы ДНК, выделенные из клинического материала: соскобы с высыпаний, везикулярная жидкость, СМЖ, отделяемое конъюнктивы, плазма периферической крови, плазма пуповинной крови, капиллярная кровь, амниотическая жидкость, слюна, смывы из ротоглотки, мазки из ротоглотки.

Взятие периферической крови и плазма пуповинной крови производится в пробирку с 6 % ЭДТА или 6 % ЭДТА и гелем.

Взятие капиллярной крови производится в пробирку с 6 % ЭДТА.

8.1. Процедура получения клинического материала

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики: методические рекомендации», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора⁴.

Забор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами III группы патогенности.

8.1.1. Соскобы с высыпаний

Взятие материала для ПЦР-исследования производить с помощью зонда-тампона в одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл (например, микроцентрифужные пробирки «Axygen, Inc.»), США или аналогичные) с транспортной средой (стерильный физиологический раствор, 0,01 М калий-фосфатный буфер, рН 7,0).

⁴ Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики: методические рекомендации / Домонова Э.А., Творогова М.Г., Подколзин А.Т. [и др.]. Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, 2021.

Предварительно обработать пораженный участок кожи тампоном, смоченным 70 % раствором этилового спирта. Исследуемый материал перенести в пробирку с помощью пинцета. Пробирку плотно закрыть крышкой. Поверхностные корочки и чешуйки в центре кольцевидных высыпаний не пригодны для исследования!

Хранение и транспортировка:

- от 18 °С до 25 °С – в течение 1 мес.;
- -68 °С и ниже – длительно.

Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

8.1.2. Везикулярная жидкость

Взятие материала для ПЦР-исследования производить в полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5; 2,0 мл (например, микроцентрифужные пробирки «Ахуген, Inc.», США или аналогичные) с транспортной средой.

Перед взятием кожные элементы обработать тампоном, смоченным 70 % раствором этилового спирта. Корочки или покрышки везикул отделить от кожи скальпелем и пинцетом, затем сделать прокол у основания стерильной иглой, наклоняя ее свободный конец вниз для облегчения сбора содержимого в пробирку с 0,5 мл транспортной среды. Для ускорения взятия содержимого дополнительно надавить сверху на кожный элемент пинцетом.

Хранение и транспортировка:

- от 18 °С до 25 °С – в течение 48 ч;
- от 2 °С до 8 °С – в течение 7 суток;
- -20 °С и ниже – длительно.

Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

8.1.3. Спинномозговая жидкость

Взятие материала для ПЦР-исследования производить в пробирки с винтовой горловинной крышкой объемом 5,0 мл (например, «Ахуген, Inc.» (США) или аналогичные) или одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, микроцентрифужные пробирки «Ахуген, Inc.», США или аналогичные) или контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов для анализа объемом 30,0 мл (стерильный, в индивидуальной упаковке) (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия или аналогичный).

Спинномозговую жидкость отобрать методом аспирации в объеме не менее 1,0 мл в пробирку или контейнер путем прокола поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков пункционными иглами. Пробирку или контейнер плотно закрыть крышкой.

Хранение и транспортировка:

- от 2 °С до 8 °С – в течение 24 ч;
- от -24 °С до -16 °С – в течение 3 мес.;
- -68 °С и ниже – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

8.1.4. Отделяемое конъюнктивы

Взятие материала для ПЦР-исследования производить с помощью зонда-тампона в одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5; 2,0 мл (например, микроцентрифужные пробирки «Ахуген, Inc.», США или аналогичные) с транспортной средой.

Взятие материала производить под местной анестезией (например, 2 капли препарата Дикаин (раствор 0,3 %)). Оттянув нижнее веко, провести вращающими движениями рабочей частью зонда-тампона по конъюнктиве 4–5 раз, захватывая внутренний и внешний углы глаза. Перенести зонд-тампон в пробирку с 0,5 мл транспортной среды. Рабочую часть зонда-тампона, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. Пробирку плотно закрыть крышкой, не

допуская зазора и смятия внутренней части крышки. В случае невозможности обламывания погрузить рабочую часть зонда-тампона в транспортную среду и, прижав ее к внутренней стенке пробирки, вращать 5–10 с, после чего зонд удалить, пробирку плотно закрыть. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда-тампона!

Хранение и транспортировка:

- от 18 °С до 25 °С – в течение 6 ч;
- от 2 °С до 8 °С – в течение 3 суток;
- от -24 °С до -16 °С – в течение 7 суток;
- -68 °С и ниже – длительно.

8.1.5. Плазма периферической крови и плазма пуповинной крови.

Взятие материала для ПЦР-исследования производить одноразовой иглой (диаметр 0,8–1,1 мм) в пробирку с антикоагулянтом.

Взятие крови произвести в пробирку с 6 % ЭДТА или 6 % ЭДТА и гелем.

Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя!

Закрытую пробирку с кровью сразу после взятия несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке с антикоагулянтом тщательно перемешалась. После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

Для получения плазмы крови пробирки с цельной кровью центрифугировать при 600 g (например, 3000 об/мин для центрифуги «MiniSpin», «Eppendorf», Германия) в течение 10 минут при температуре от 18 °С до 25 °С. Далее аликвоту плазмы крови в объеме не менее 1,0 мл перенести в пробирки объемом 2,0 или 5,0 мл, используя наконечник с фильтром. Плазму крови необходимо перенести в новую пробирку в течение 6 ч с момента взятия образца крови.

Хранение и транспортировка:

- от 2 °С до 8 °С – в течение 5 суток;
- от -24 до -16 °С – в течение 3 мес.;
- -68 °С и ниже – длительно.

Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

8.1.6. Капиллярная кровь

Взятие материала для ПЦР-исследования производить одноразовой иглой (диаметр 0,8–1,1 мм) либо скарификатором в пробирку с антикоагулянтом.

Взятие крови произвести в пробирку с 6% ЭДТА.

Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя!

Закрытую пробирку с кровью сразу после взятия несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке с антикоагулянтом тщательно перемешалась. После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

До проведения процедуры выделения ДНК недопустимо замораживание образцов цельной крови!

Хранение и транспортировка образцов цельной крови:

- от 18 °С до 25 °С – в течение 2 ч;
- от 2 °С до 8 °С – в течение 3 суток с момента взятия материала.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

8.1.7. Амниотическая жидкость

Взятие материала производить в одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, микроцентрифужные пробирки «Ахуген, Inc.», США или аналогичные) или с винтовой горловинной крышкой объемом 5,0; 10,0 мл (например, «Ахуген, Inc.», США или аналогичные).

Амниотическую жидкость отобрать методом аспирации в объеме не менее 1,0–2,0 мл в пробирку при выполнении процедуры амниоцентеза. Пробирку плотно закрыть крышкой.

Хранение и транспортировка:

- от 2 °С до 8 °С – в течение 24 ч;

- от -24 °С до -16 °С – в течение 1 мес.;
- -68 °С и ниже – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

8.1.8. Слюна

Взятие материала для ПЦР-исследования производить в одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, микроцентрифужные пробирки «Ахуген, Inc.», США или аналогичные) или пробирки с винтовой горловинной крышкой объемом 5,0 мл (например, «Ахуген, Inc.», США или аналогичные) или контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов для анализа объемом 30,0 мл (стерильный, в индивидуальной упаковке) (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия или аналогичный).

Провести трехкратное полоскание полости рта 0,9% раствором натрия хлорида или кипяченой водой. Слюну в объеме не менее 1,0–2,0 мл собрать в пробирку или контейнер, плотно закрыть крышкой

Хранение и транспортировка:

- от 18 °С до 25 °С – в течение 6 ч;
- от 2 °С до 8 °С – в течение 24 ч;
- от -24 °С до -16 °С – в течение 7 суток;
- -68 °С и ниже – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

8.1.9. Смывы из ротоглотки

Взятие материала для ПЦР-исследования производить в контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов для анализа объемом 60,0 мл (стерильный, в индивидуальной упаковке) (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия или аналогичный).

Провести предварительное однократное полоскание полости рта 0,9 % раствором натрия хлорида или кипяченой водой. После этого провести тщательное полоскание ротоглотки 25,0–40,0 мл 0,9%

раствора натрия хлорида в течение 10–15 с. Промывную жидкость собрать в контейнер, плотно закрыть крышкой.

Хранение и транспортировка:

- от 18 °С до 25 °С – в течение 6 ч;
- от 2 °С до 8 °С – в течение 3 суток;
- от -24 °С до -16 °С – в течение 7 суток;
- -68 °С и ниже – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

8.1.10. Мазки из ротоглотки

Взятие материала для ПЦР-исследования производить с помощью зонда-тампона в одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5; 2,0 мл (например, микроцентрифужные пробирки «Ахуген, Inc.», США или аналогичные) с транспортной средой.

Рабочей частью зонда-тампона провести вращательными движениями по поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. Перенести зонд-тампон в пробирку с 0,5 мл транспортной среды (в качестве транспортной среды рекомендуется использовать реагент для сбора, транспортирования и выделения ДНК из клинического материала «ДНК-Фаст», ООО «ТестГен» по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 05.06.2023). Рабочую часть зонда-тампона, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки. В случае невозможности обламывания погрузить рабочую часть зонда-тампона в транспортную среду и, прижав ее к внутренней стороне пробирки, вращать 5–10 с, после чего зонд удалить, пробирку плотно закрыть. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда-тампона!

Хранение и транспортировка:

- от 18 °С до 25 °С – в течение 6 ч;
- от 2 °С до 8 °С – в течение 3 суток;

- от -24 до -16 °С – в течение 7 суток;
- -68 °С и ниже – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Учет, хранение, передача и транспортирование клинического материала, подозрительного на наличие урогенитальных инфекций, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13) и действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности.

Утилизация клинического материала (класс В), как чрезвычайно эпидемиологически опасных отходов, осуществляется в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

8.2. Процедура получения пробы ДНК

При использовании форм комплектации 1 и 3 рекомендуется использование следующих наборов реагентов для выделения ДНК:

- Реагент для сбора, транспортирования и выделения ДНК из клинического материала «ДНК-Фаст» по ТУ 21.20.23-016-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2021/14885 от 05.06.2023).

- 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 05.06.2023).

Во время процедуры выделения ДНК необходимо строго соблюдать протокол и требования инструкции применяемого набора реагентов.

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК

- от 2 °С до 8 °С – не более 24 ч;
- от -22 °С до -18 °С – не более месяца;
- ниже -70 °С – длительно.

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.

Для форм комплектации 1 и 2

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

Перед приготовлением реакционных смесей 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. Перед проведением исследования необходимо разморозить компоненты набора при комнатной температуре.

1. Перед этапом пробоподготовки тщательно перемешать содержимое пробирки с ВКО (в случае, если набор хранился при отрицательных температурах, содержимое пробирки необходимо полностью разморозить при комнатной температуре).

2. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа ДНК, ПЦР-буфером, праймер-миксом, ОКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 сек., затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

3. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,1–0,2 мл для ПЦР из расчета: количество исследуемых образцов + 1 (ПКО) + 1 (ОКО).

Для форм комплектации 3 и 4

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

Перед восстановлением лиофильных компонентов набора 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. Перед проведением исследования необходимо разморозить компоненты набора при комнатной температуре.

Перед началом работы необходимо выдержать компоненты набора при температуре от 18 °С до 25 °С в течение 30 минут.

Вскрыть флакон с ВКО. Добавить 960 мкл раствора для восстановления ВКО. Плотно закрыть флакон. Аккуратно перемешать, выдержать при температуре от 18 °С до 25 °С в течение 15 минут, после чего вновь перемешать. После разведения хранить при температуре от -22 °С до -18 °С в течение 1 года или при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 1 месяца.

Вскрыть флакон с ПКО и добавить: 704 мкл раствора для восстановления ПКО. Плотно закрыть флакон. Аккуратно перемешать, выдержать при температуре от 18 °С до 25 °С в течение 15 минут, после чего вновь перемешать. После разведения хранить при температуре от -22 °С до -18 °С в течение 1 года или при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 1 месяца.

10. Проведение анализа

К работе с набором допускается только специально обученный персонал с навыками проведения ПЦР-анализов!

А. Этап выделения ДНК

Выделение ДНК с помощью Комплекта реагентов для выделения ДНК «ДНК-extra-VZV» («VZV-test» формы комплектации 2 и 4) можно проводить для следующих видов биоматериала: соскобы с высыпаний, везикулярная жидкость, СМЖ, отделяемое конъюнктивы, плазма периферической крови, плазма пуповинной крови, капиллярная кровь, амниотическая жидкость, слюна, смывы из ротоглотки, мазки из ротоглотки.

Расслоение или выпадение осадка не влияет на качество растворов. Если во флаконах образовался осадок или расслоение, необходимо прогреть их при 70 °С и перемешать до полного растворения осадка и гомогенизации растворов.

Все компоненты набора перед использованием необходимо перемешать.

Протокол выделения ДНК ручным методом:

Для каждого исследуемого образца приготовить и промаркировать по одной пробирке объемом 1,5–2,0 мл (образцы ПКО и ОКО не проходят процедуру выделения ДНК).

1. Добавить в каждую пробирку:

Буфер для связывания – 500 мкл;

Раствор магнитных частиц – 10 мкл;

ВКО – 10 мкл.

Для выделения большого числа образцов возможно предварительное приготовление смеси в отдельной пробирке по следующей схеме:

Буфер для связывания – 500*(**n+1**) мкл;

Раствор магнитных частиц – 10*(**n+1**) мкл;

ВКО – 10*(**n+1**) мкл;

где **n** – число образцов для выделения

Следует перенести в каждую пробирку по 520 мкл смеси буфера для связывания, магнитных частиц и ВКО.

2. Внести по 100 мкл образца клинического материала в каждую пробирку, перемешать на вортексе 3–5 секунд. Для лизиса инкубировать пробирки при 70 °С в течение 5 минут, перемешивая раствор за время инкубации 1–2 раза на вортексе.

3. По завершении лизиса перенести пробирки в лабораторный штатив и инкубировать смесь для связывания ДНК при комнатной температуре в течение 10 минут, перемешивая раствор во время инкубации 2–3 раза путем переворачивания пробирок.

4. Поместить пробирки в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирок (обычно требуется 1–2 минуты) и удалить супернатант с помощью дозатора или аспиратора.

5. Внести в пробирки по 700 мкл раствора для промывки №1, плотно закрыть крышки, ресуспендировать магнитные частицы на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием.

6. Поместить пробирки в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирок и удалить супернатант.

7. Внести в пробирки по 700 мкл раствора для промывки № 2, плотно закрыть крышки, ресуспендировать магнитные частицы на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием.

8. Поместить пробирки в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и удалить супернатант.

9. Повторить пункты 7 и 8.

10. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат и инкубировать при 70 °С в течение 5 минут для просушки магнитных частиц и удаления остаточного спирта.

11. Внести в пробирки по 50 мкл элюента, используя отдельный наконечник с фильтром. Тщательно ресуспендировать магнитные частицы пипетированием, плотно закрыть крышки.

12. Инкубировать пробирки при 70 °С в течение 10 минут. Во время инкубации 2–3 раза перемешать содержимое пробирок путем осторожного взбалтывания осадка.

13. Поместить пробирки в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирок.

14. Перенести супернатант, содержащий выделенную ДНК, в новые пробирки. **ВНИМАНИЕ!** Отбор очищенной ДНК осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива

Протокол выделения ДНК автоматическим методом:

Процедура выделения ДНК Комплектом реагентов для выделения ДНК «ДНК-extra-VZV» с помощью пипетирующих станций (например Tecan серии Freedom EVO® или аналогичные):

1. Перенести все содержимое пробирки с «Магнитными частицами» (960 мкл) во флакон с «Буфером для связывания». Данная смесь может храниться в течение 7 суток. Следует тщательно перемешивать приготовленную суспензию магнитных частиц в «Буфере для связывания» перед каждым использованием;

2. Подготовить роботизированную станцию пробоподготовки в соответствии с инструкцией по ее применению;

3. Перелить подготовленные растворы из флаконов в кюветы и загрузить их на станцию в порядке, описанном в протоколе работы станции.

4. Загрузить специальные наконечники, пробирки для выполнения реакций выделения ДНК и пробирок для выделенной ДНК на станцию в порядке, описанном в протоколе работы станции.

5. В программном обеспечении станции загрузить соответствующий протокол выделения для работы с набором «ДНК-extra-VZV» (файл протокола доступен по запросу).

6. Запустить процесс выполнения протокола выделения.

7. По завершении процедуры выделения ДНК, извлечь из станции пробирки с выделенной ДНК.

8. Убрать из станции использованные расходные материалы, провести уборку в соответствии с инструкцией.

Процедура выделения ДНК Комплектом реагентов для выделения ДНК «ДНК-extra-VZV» с помощью магнитоперемешивающих станций (KingFisher Flex 96 или аналогичные)

Перед выделением необходимо внести реагенты в глубоколоночные планшеты 96DW по следующей схеме:

Таблица 18 – Схема внесения реагентов для автоматического выделения на магнитоперемешивающих станциях

№ планшета	Компонент	Количество компонента на 1 лунку планшета, мкл
Планшет 1	Буфер для связывания	500
	Магнитные частицы	10
	ВКО	10
Планшет 2	Раствор для промывки № 1	700
Планшет 3	Раствор для промывки № 2	700
Планшет 4	Раствор для промывки № 2	700
Планшет 5	Элюент	100
Планшет 6	Гребенка наконечников	-

1. Перенести все содержимое пробирки с «Магнитными частицами» (960 мкл) во флакон с «Буфером для связывания». Данная смесь может храниться в течение 7 суток. Следует тщательно перемешивать приготовленную суспензию магнитных частиц в «Буфере для связывания» перед каждым использованием.

2. Промаркировать планшеты 96DW и внести в них реагенты согласно схеме (таблица 18). Для внесения реагентов может быть использован одноканальный или многоканальный автоматический дозатор переменного объема. Внесение реагентов может быть также выполнено с помощью автоматической станции пробоподготовки. Внимание: каждый реагент вносится отдельным наконечником, не допускается попадание остатков одного реагента в другой.

3. Подготовить оборудование в соответствии с инструкцией по его применению.

4. Загрузить в прибор протокол выделения протокол (файл протокола доступен по запросу).

5. В лунки планшета 1 внести по 100 мкл анализируемого образца клинического материала.

6. Расставить планшеты и гребенку наконечников для магнитных стержней в соответствии с указаниями прибора, и запустить процедуру выделения ДНК по загруженному протоколу работы автоматической станции.

7. По окончании работы прибора, в лунках планшета 5 находится элюент, содержащий выделенную ДНК.

Пробоподготовку с помощью набора реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала «НК-Экстра» (совместно с формой комплектации 1 и 3) можно проводить для следующих видов биоматериала: плазма периферической крови, плазма пуповинной крови, капиллярная кровь, мазки из ротоглотки.

Заявленная чувствительность 500 копий/мл.

Пробоподготовка осуществляется в соответствии с инструкцией к набору реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала «НК-Экстра».

Пробоподготовку с помощью реагента для сбора, транспортирования и выделения ДНК из клинического материала «ДНК-Фаст» (совместно с формой комплектации 1 и 3) можно проводить для следующих видов биоматериала: слюна, мазки из ротоглотки.

Заявленная чувствительность 1000 копий/мл.

Пробоподготовка осуществляется в соответствии с инструкцией к реагенту для сбора, транспортирования и выделения ДНК из клинического материала «ДНК-Фаст».

Б. Подготовка ПЦР

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

Схема постановки ПЦР для образцов, подготовленных с помощью набора «НК-Экстра» (для формы комплектации 1) и Комплекта реагентов для выделения ДНК «ДНК-extra-VZV» (форма комплектации 2)

Общий объем реакции – 25 мкл.

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

Для приготовления реакционной смеси на 1 реакцию необходимо:

- ПЦР-буфер – 5 мкл;
- праймер-микс – 5 мкл;
- образец⁵ – 15 мкл.

Общее количество пробирок с учетом ПКО и ОКО рассчитывается по формуле:

$N = n + 2$, где n – количество образцов

Готовить реакционные пробирки в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,2 мл для ПЦР;
2. Внести в каждую пробирку по 5 мкл ПЦР-буфера;
3. Внести по 5 мкл праймер-микса;
4. Внести в соответствующие пробирки по 15 мкл образца (включая ПКО и ОКО, без выделения);
5. Закрыть пробирки;
6. Для сброса капель со стенок центрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Пробы готовы для проведения амплификации.

⁵ Здесь и далее в данной главе под определением «Образец» имеется ввиду исследуемый образец ДНК, ПКО или ОКО

Для исследования большого числа образцов возможен вариант приготовления смеси ПЦР-буфера и праймер-микса:

1. В отдельной пробирке смешать указанные объемы ПЦР-буфера и праймер-микса.

Объемы добавляемых ПЦР-буфера и праймер-микса определяются по формулам:

$$V_{\text{ПЦР-буфера}} = 5 * (n + 1) \text{ мкл};$$

$$V_{\text{праймер-микса}} = 5 * (n + 1) \text{ мкл};$$

где n – общее количество пробирок с образцами (включая ОКО и ПКО).

2. Добавить в каждую ПЦР-пробирку по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и праймер-микса;

3. Внести в соответствующие ПЦР-пробирки по 15 мкл образца (включая ПКО и ОКО, без выделения);

4. Закрыть пробирки, перемешать содержимое;

5. Для сброса капель со стенок центрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Схема постановки ПЦР для образцов, подготовленных с помощью реагента «ДНК-Фаст» (для формы комплектации 1)

Общий объем реакции – 25 мкл.

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

Для приготовления реакционной смеси на 1 реакцию необходимо:

ПЦР-буфер – 5 мкл;

праймер-микс – 5 мкл;

ВКО – 2,5 мкл;

ОКО – 7,5 мкл;

образец – 5 мкл.

Общее количество пробирок с учетом ПКО и ОКО рассчитывается по формуле:

$$N = n + 2, \text{ где } n - \text{ количество образцов}$$

Готовить реакционные пробирки в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,2 мл для ПЦР;
2. Внести в каждую пробирку по 5 мкл ПЦР-буфера;
3. Внести в каждую пробирку по 5 мкл праймер-микса;
4. Внести в каждую пробирку по 2,5 мкл ВКО;
5. Внести в каждую пробирку по 7,5 мкл ОКО;
6. Внести в соответствующие пробирки по 5 мкл образца (включая ПКО и ОКО);
7. Закрывать пробирки;
8. Для сброса капель со стенок центрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Пробы готовы для проведения амплификации.

Для исследования большого числа образцов возможен вариант приготовления смеси ПЦР-буфера, праймер-микса, ВКО и ОКО:

1. В отдельной пробирке смешать указанные объемы ПЦР-буфера, праймер-микса, ВКО и ОКО. Объемы добавляемых ПЦР-буфера, праймер-микса, ВКО и ОКО определяется по формуле:

$$V_{\text{ПЦР-буфера}} = 5 * (n + 1) \text{ мкл};$$

$$V_{\text{праймер-микса}} = 5 * (n + 1) \text{ мкл};$$

$$V_{\text{ВКО}} = 2,5 * (n + 1) \text{ мкл};$$

$$V_{\text{ОКО}} = 7,5 * (n + 1) \text{ мкл};$$

где n – общее количество пробирок с образцами (включая ОКО и ПКО).

2. Добавить в каждую ПЦР-пробирку по 20 мкл смеси ПЦР-буфера, праймер-микса, ВКО и ОКО;

3. Внести в соответствующие ПЦР-пробирки по 5 мкл образца (включая ПКО и ОКО);

4. Закрывать пробирки, перемешать содержимое;

5. Для сброса капель со стенок центрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Схема постановки ПЦР для образцов, подготовленных с помощью набора «НК-Экстра» (для формы комплектации 3) и комплекта реагентов для выделения ДНК «ДНК-extra-VZV» (форма комплектации 4)

1. Вскрыть упаковку с ЛРС, с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество пробирок с ЛРС (включая контрольные образцы). Отрезать пробирки следует с покрывающей их пленкой.

2. Неиспользованные пробирки с ЛРС упаковать в пакет с осушителем, удалить воздух и плотно закрыть. После первого вскрытия упаковки ЛРС хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 месяцев.

Общий объем реакции – 25 мкл (включая лиофилизат).

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объем реакции.

3. Промаркировать пробирки в соответствии с протоколом, включая контрольные образцы (отрицательный и положительный).

4. Аккуратно удалить пленку с пробирок, следя, чтобы лиофильная смесь ЛРС не была удалена вместе с пленкой.

5. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 22 мкл выделенной ДНК и 3–5 раз перемешать пикетированием, избегая при этом образование пены. В пробирки для ПКО и ОКО препарат ДНК не вносится.

6. Внести в соответствующую пробирку 22 мкл ПКО и 3–5 раз перемешать пикетированием.

7. Внести в соответствующую пробирку 22 мкл ОКО (без выделения) и 3–5 раз перемешать пипетированием.

8. Заклеить планшет/пробирки пленкой, входящей в состав набора.

9. Для сброса капель со стенок центрифугировать пробирки в течение 30 секунд.

10. Выдержать пробирки в течение 3-5 минут для восстановления реакционной смеси при комнатной температуре.

Схема постановки ПЦР для образцов, подготовленных с помощью реагента «ДНК-Фаст» (для формы комплектации 3)

1. Вскрыть упаковку с ЛРС, с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество пробирок с ЛРС (включая контрольные образцы). Отрезать пробирки следует с покрывающей их пленкой.

2. Неиспользованные пробирки с ЛРС упаковать в пакет с осушителем, удалить воздух и плотно закрыть. После первого вскрытия упаковки ЛРС хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 месяцев.

Общий объем реакции – 25 мкл (включая лиофилизат).

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

3. Промаркировать пробирки в соответствии с протоколом, включая контрольные образцы (отрицательный и положительный).

4. Аккуратно удалить пленку с пробирок, следя, чтобы лиофильная смесь ЛРС не была удалена вместе с пленкой.

5. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (в том числе для ПКО) по:

- 15 мкл ОКО,

- 2,5 мкл ВКО,

- 5 мкл выделенной ДНК (или ПКО и ОКО в соответствующие промаркированные пробирки) и 3–5 раз перемешать пикетированием, избегая при этом образование пены.

6. Заклеить планшет/пробирки пленкой, входящей в состав набора.

7. Для сброса капель со стенок центрифугировать пробирки в течение 30 секунд.

8. Выдержать пробирки в течение 3–5 минут для восстановления реакционной смеси при комнатной температуре.

В. ПЦР-амплификация ДНК и гибридизационно-флюоресцентная детекция 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 флюоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ПЦР для амплификаторов ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), CFX 96 (Bio-Rad, США), FLUORITE (АО «Вектор-Бест», Россия) указан в таблице 19.

Таблица 19 – Протокол ПЦР для «VZV-test»

Стадия	Температура, °С	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	02:00	-	1
2	95	00:15	-	5
	64	00:20		
3	95	00:15	-	40
	64	00:20	FAM/Green, HEX/Yellow	

3. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок в ячейках реакционного модуля в соответствии с их расстановкой.

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

Внимание! При использовании форм комплектации 3 и 4 для прибора ДТпрайм необходимо настроить экспозиции для каналов: Fam – 500, Hex – 1000.

5. Запустить ПЦР с детекцией флюоресцентного сигнала.

6. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

11. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят по завершении ПЦР с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне, соответствующем 5–10 % от максимального уровня флюоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t каналов FAM/Green и HEX/Yellow (табл. 1).

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

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Прохождение ПЦР исследования считается корректным, если для отрицательного и положительного контрольных образцов получены следующие результаты (табл. 20).

Таблица 20 – Результаты исследования для отрицательного и положительного контрольных образцов, соответствующие корректному прохождению ПЦР

Контрольный образец	Выбранный флюорофор	
	FAM/Green	HEX/Yellow
ОКО	отсутствует	не учитывается
ПКО	$Ct \leq 28$	$Ct \leq 28$

При получении для отрицательного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 20, 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 20 требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 20 необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

Принципы интерпретации результатов отражены в таблице 21.

Таблица 21 – Принцип интерпретации результатов

Значения Ct		Результат
Канал специфики (FAM/Green)	Канал ВКО (HEX/Yellow)	
$Ct \leq 35$	не учитывается	ДНК Varicella Zoster virus обнаружена
$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct \leq 35$	ДНК Varicella Zoster virus не обнаружена или ниже предела обнаружения
$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct > 35$ или отсутствует	Результат невалидный

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

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

Диагностическое значение полученного результата исследования:

Полученные результаты могут использоваться для диагностики заболеваний, вызванных Varicella Zoster virus.

Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации в сочетании с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

Таблица 22 – Условия хранения набора

Форма комплектации	Комплект реагентов	Условия хранения	Длительность	Примечание
ФК 1 «VZV-test»	«VZV-test»	от -22 °С до -18 °С	12 мес.	Допускается заморозка /оттаивание не более 10 раз
		от 2 °С до 8 °С	не более 90 суток	
ФК 2 «VZV-test-extra»	«ДНК-extra-VZV»	от 2 °С до 30 °С	12 мес.	Заморозка не допускается!
	«VZV-test»	от -22 °С до -18 °С	12 мес.	Допускается заморозка /оттаивание не более 10 раз
		от 2 °С до 8 °С	не более 90 суток	
ФК 3 «VZV-test-Lyo»	«VZV-test-Lyo»	от 2 °С до 25 °С	12 мес.	Заморозка не допускается!
ФК 4 «VZV-test-extra-Lyo»	«ДНК-extra-VZV»	от 2 °С до 30 °С	12 мес.	Заморозка не допускается!
	«VZV-test-Lyo»	от 2 °С до 25 °С	12 мес.	Заморозка невосстановленной лиофильной смеси не допускается!

Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

Транспортирование

Таблица 23 – Условия транспортирования набора

Форма комплектации	Комплект реагентов	Условия хранения	Длительность	Примечание
ФК 1 «VZV-test»	«VZV-test»	от -22 °С до -18 °С	12 мес.	Транспортировка при температуре свыше 25 °С запрещена!
		от 2 °С до 8 °С	не более 90 суток	
		от 8 °С до 25 °С	не более 5 суток	
ФК 2 «VZV-test-extra»	«ДНК-extra-VZV»	от 2 °С до 30 °С	12 мес.	Заморозка не допускается!
	«VZV-test»	от -22 °С до -18 °С	12 мес.	Транспортировка при температуре свыше 25 °С запрещена!
		от 2 °С до 8 °С	не более 90 суток	
		от 8 °С до 25 °С	не более 5 суток	
ФК 3 «VZV-test-Lyo»	«VZV-test-Lyo»	от 2 °С до 25 °С	12 мес.	Встряхивание не допускается!
ФК 4 «VZV-test-extra-Lyo»	«ДНК-extra-VZV»	от 2 °С до 30 °С	12 мес.	Заморозка не допускается!
	«VZV-test-Lyo»	от 2 °С до 25 °С	12 мес.	Встряхивание не допускается!

Транспортировать компоненты набора реагентов «VZV-test» всех форм комплектации следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов в формах комплектации 1 («VZV-test») и 2 («VZV-test-extra») помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объем и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с

транспортируемыми наборами реагентов, а также объем термодомтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

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

Срок годности

Срок годности набора реагентов «VZV-test» во всех формах комплектации – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

Срок годности вскрытых компонентов набора

Таблица 24 – Условия хранения и срок годности вскрытых компонентов набора

Форма комплектации	Комплект реагентов	Условия хранения	Срок годности
ФК 1 «VZV-test»	«VZV-test»	от -22 °С до -18 °С	12 мес.
ФК 2 «VZV-test-extra»	«ДНК-extra-VZV»	от 2 °С до 30 °С	12 мес.
	«VZV-test»	от -22 °С до -18 °С	12 мес.
ФК 3 «VZV-test-Lyo»	«VZV-test-Lyo»	ПКО и ВКО после восстановления от -22 °С до -18 °С	12 мес.
		ПКО и ВКО после восстановления от 2 °С до 8 °С	1 мес.
		после вскрытия упаковки с ЛРС (пакет с замком Zip-Lock) от 2 °С до 8 °С	3 мес.
ФК 4 «VZV-test-extra-Lyo»	«ДНК-extra-VZV»	от 2 °С до 30 °С	12 мес.
	«VZV-test-Lyo»	ПКО и ВКО после восстановления от -22 °С до -18 °С	12 мес.
		ПКО и ВКО после восстановления от 2 °С до 8 °С	1 мес.
		после вскрытия упаковки с ЛРС (пакет с замком Zip-Lock) от 2 °С до 8 °С	3 мес.

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.

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 СанПиН 2.1 3684 21 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» собираются в одноразовую маркированную упаковку 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 остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «VZV-test» 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 соответствие комплекта реагентов «VZV-test» требованиям ТУ при соблюдении установленных требований к транспортированию, хранению и 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

Символы маркировки

Символ	Расшифровка
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Обратитесь к инструкции по применению
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Температурный диапазон
	Код партии
	Использовать до...
	Дата изготовления
	Хрупкое, обращаться осторожно
	Пиктограмма «Верх» показывает правильное положение груза в пространстве. Стрелки указывают на верхнюю часть содержимого. Транспортную упаковку с этим символом нельзя переворачивать или сваливать на бок. Ее нужно хранить и перевозить исключительно вертикально.

Приложение Б

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2021	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 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 15223-1-2023	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.
ГОСТ Р ИСО 17511-2022	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Требования к установлению метрологической прослеживаемости значений, приписанных калибраторам, контрольным материалам правильности и образцам биологического материала человека