



УТВЕРЖДАЮ
Руководитель отдела сертификации
ООО «ТестГен»
Л.М. Халилова
(по доверенности №54/01 от 27 декабря 2023)
«11» мая 2024 г.

Инструкция

Набор реагентов для качественного выявления РНК вируса Зика методом ОТ-ПЦР-РВ «ZIK-test»

Только для научно-исследовательских целей

1) Наименование и (или) торговое наименование изделия

Набор реагентов для качественного выявления РНК вируса Зика методом ОТ-ПЦР-РВ «ZIK-test»

Сокращенное наименование – набор реагентов «ZIK-test».

2) Сведения о производителе изделия

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

3) Назначение изделия

Назначение: набор реагентов «ZIK-test» предназначен для качественного выявления специфичных участков геномной РНК вируса Зика методом одностадийной обратной транскрипции – мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в пробе нуклеиновых кислот, выделенной из плазмы крови человека, у пациентов с подозрением на инфицирование вирусом Зика.

Функциональное назначение – полученные результаты могут использоваться для диагностики заболевания, вызванного вирусом Зика (Zika virus).

Описание того, что определяется и (или) измеряется (аналит) – РНК вируса Зика.

Лихорадка Зика – передаваемое комарами вирусное заболевание, возбудителем которого является РНК-вирус, принадлежащий к роду флавивирусов (*Flavivirus*) из семейства Flaviviridae.

Специфическое расстройство, состояние или фактор риска для обнаружения, определения или дифференцирования которого предназначено медицинское изделие – набор реагентов «ZIK-test» предназначен для качественного выявления РНК методом одностадийной обратной транскрипции – мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной

детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) с целью диагностики лихорадки Зика, вызванной вирусом Зика (ZIKV).

Предназначение изделия для качественных, полуколичественных или количественных определений – набор реагентов «ZIK-test» предназначен для качественного выявления РНК.

Тип анализируемого образца – материалом для проведения ОТ-ПЦР служат: пробы РНК, выделенные из плазмы крови (для формы комплектации 1); образцы плазмы крови (для формы комплектации 2).

Показания к применению: набор реагентов «ZIK-test» рекомендуется к применению у пациентов с клинической симптоматикой вирусного заболевания, подозрительного на инфекцию, вызванную вирусом Зика.

Противопоказания к применению: отсутствуют.

4) Набор реагентов «ZIK-test» предназначен для клинической лабораторной диагностики.

5) Потенциальный потребитель изделия

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

6) Принцип теста

Метод

Одностадийная обратная транскрипция – мультиплексная полимеразная цепная реакция с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

Принцип определения

Выявление РНК вируса Зика основано на использовании метода одностадийной реакции обратной транскрипции с

последующим проведением полимеразной цепной реакции в реальном времени в одной пробирке.

В состав ОТ-ПЦР-буфера 5х входят все основные реагенты, включая ревертазу с «тёплым стартом», термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты и оптимизированный буфер (в форме комплекта 2 смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов находится в составе праймер-микса).

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

Набор содержит реагенты для качественного определения РНК вируса Зика и фрагмента РНК внутреннего контрольного образца (далее ВКО): продукты амплификации вируса Зика регистрируются по каналу, соответствующему флуорофору FAM/Green, продукты амплификации ВКО – по HEX/Yellow (табл. 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору	
FAM / Green	HEX / Yellow
РНК вируса Зика	ВКО

ВКО позволяет оценить возможное наличие ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам и/или эффективность выделения РНК.

Общее время проведения анализа составляет 80–100 мин в зависимости от используемой модели амплификатора (без учета пробоподготовки).

7) Описание реагентов, калибраторов и контрольных материалов

Варианты исполнения

Набор реагентов выпускается в 2-х вариантах комплектации:

1) Форма комплектации 1

Состав: комплект реагентов для ОТ-ПЦР «ZIK-test-Classic».

2) Форма комплектации 2 – не требует процедуры выделения РНК из биологического материала (прямая ОТ-ПЦР-РВ)

Состав: комплект реагентов для ОТ-ПЦР «ZIK-test-Cito».

Количество анализов

Наборы реагентов «ZIK-test» каждой формы комплектации (таблицы 2–3) рассчитаны на 96 реакций, что соответствует определению 94 исследуемых образцов, отрицательных и положительных контрольных образцов при единичном запуске амплификатора на 96 лунок или 32 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Состав набора

Таблица 2 – Состав набора реагентов «ZIK-test-Classic», форма комплектации 1

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «ZIK-test-Classic»			
1.	ОТ-ПЦР-буфер 5x	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2.	Праймер-микс	Прозрачная жидкость с возможным сиреневым оттенком	1 пробирка, 480 мкл
3.	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
4.	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки по 1600 мкл
5.	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 940 мкл

Таблица 3 – Состав набора реагентов «ZIK-test-Cito», форма комплектации 2

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «ZIK-test-Cito»			
1.	ОТ-ПЦР-буфер-Cito 5x	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2.	Праймер-микс	Прозрачная жидкость с возможным сиреневым оттенком	1 пробирка, 480 мкл
3.	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
4.	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
5.	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 940 мкл

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

ОТ-ПЦР-буфер 5х готов к использованию и содержит все основные реагенты, включая ревертазу с «тёплым стартом», термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты и оптимизированный буфер.

ОТ-ПЦР-буфер-Cito 5х готов к использованию и содержит генетически модифицированную ревертазу MMLV с подавленной активностью РНКазы Н, ДНК-полимеразу с «горячим стартом» и буфер, позволяющий проводить ОТ-ПЦР в присутствии большого количества ингибиторов

Праймер-микс готов к использованию и содержит праймеры и зонды, предназначенные для выявления специфических мишеней:

1. Праймеры и зонд к фрагменту специфичного участка геномной РНК вируса Зика. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.

2. Праймеры и зонд к внутреннему контрольному образцу. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Праймер-микс формы комплектации 2 дополнительно содержит дезоксинуклеотидтрифосфаты.

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и содержит выявляемые набором реагентов специфические фрагменты генома вируса Зика и внутреннего контрольного образца. ПКО находится в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА) с добавлением 0,05% азида натрия.

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

Внутренний контрольный образец (ВКО) готов к использованию и представляет собой препарат армированной РНК.

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

Внимание! Для постановки реакций следует использовать реагенты только из идентичной формы комплектации.

8) Перечень материалов и специальных материалов, которые требуются для проведения тестирования (анализа), но не содержатся в комплекте поставки изделия

Оборудование для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты (например, «БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия);

2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», ООО «Биоком», Россия);

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (например, Eppendorf, Германия);

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

5. Амплификатор¹ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow, например, CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, Ахуген, США);

2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 или 2,0 мл;

3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) или оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенку пробирки) для ПЦР: пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл, или пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, Ахуген, США), совместимые с используемым амплификатором;

4. Халат и одноразовые перчатки без талька;

5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;

¹ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

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

7. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и наконечников,

8. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5–2,0 мл,

9. Набор для выделения РНК для формы комплектации 1.

9) Информация для идентификации медицинских изделий с целью получения безопасной комбинации и (или) информация об известных ограничениях по совместному использованию медицинских изделий

9.1 Для экстракции РНК рекомендуется использование комплектов реагентов, предназначенных для выделения РНК из плазмы крови (например, Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала «НК-Экстра» по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019 производства ООО «ТестГен» (регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.):

- чистота выделения РНК, выраженная в отношении оптических плотностей ($A_{260/280\text{nm}}$) – не менее 1,6;
- эффективность выделения РНК – не менее 20%.

9.2 При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free».

10) сведения о специальных условиях хранения (например, температура и влажность воздуха, освещение и др.) и (или) обращения пользователей с изделием

Условия хранения

Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «ZIK-test-Classic» (форма комплектации 1) и комплект реагентов для ОТ-ПЦР «ZIK-test-Cito» (форма комплектации 2), входящие в состав набора «ZIK-test», в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от -18 °С до -22 °С в течение всего срока годности набора, допускается хранение при температуре от +2 °С до +6 °С до 30 суток. Допускается заморозка/оттаивание набора не более 10 раз.

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

11) сведения о характеристиках стабильности изделия (например, условия хранения, срок годности после первого вскрытия первичного контейнера), а также условиях хранения и стабильности рабочих растворов

Хранение.

Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «ZIK-test-Classic» (форма комплектации 1) и комплект реагентов для ОТ-ПЦР «ZIK-test-Cito» (форма комплектации 2), входящие в состав набора «ZIK-test», в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от -18 °С до -22 °С в течение всего срока годности набора, допускается хранение при температуре от +2 °С до +6 °С до 30 суток. Допускается заморозка/оттаивание набора не более 10 раз.

После вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

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

Транспортирование.

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

Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «ZIK-test-Classic» (форма комплектации 1) и комплект реагентов для ОТ-ПЦР «ZIK-test-Cito» (форма комплектации 2), входящие в состав набора «ZIK-test», транспортировать при температуре от -18 °С до -22 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от +2 °С до +6 °С до 30 суток, или при температуре окружающей среды, но не выше +25 °С не более 2 суток.

Атмосферное давление не контролируется, так как не влияет на качество изделия.

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

термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

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

Срок годности. Срок годности набора «ZIK-test» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при температуре от -18 °С до -22 °С, соблюдении всех условий транспортирования и эксплуатации. Набор реагентов с истёкшим сроком годности применению не подлежит.

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

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора – 1 час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

12) информация о стерильном состоянии, методе стерилизации и о порядке действий в случае нарушения стерильной упаковки

Стерильность: изделие не стерильно.

13) информация для пользователей (предупреждения, меры предосторожности, предпринимаемые в случае необходимости меры и ограничения при использовании изделия)

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 3 – в соответствии с Правилами классификации медицинских изделий в зависимости от потенциального риска применения, утверждены Решением коллегии ЕЭК от 22.12.2015 г. №173.

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «ZIK-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 «ZIK-test», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «ZIK-test», не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

К работе с тест-системами для диагностики лихорадки Зика в лаборатории организаций допускаются специалисты, давшие письменное согласие и прошедшие инструктаж, проведенный сотрудниками лабораторий Роспотребнадзора, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с возбудителями инфекционных заболеваний человека II группы патогенности.

Сбор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами II группы патогенности. Каждый образец материала помещают в отдельную транспортную емкость, обеспечивая требования в соответствии с таблицей настоящих методических рекомендаций.

Все образцы, собранные для лабораторных исследований, должны рассматриваться как потенциально инфекционные, и медицинский персонал, который собирает или перевозит клинические образцы, должен строго соблюдать требования биологической безопасности как при работе с микроорганизмами II группы патогенности.

Перевозка образцов должна осуществляться в соответствии с требованиями санитарного законодательства по отношению к микроорганизмам II группы патогенности.

Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». Медицинские работники, которые собирают или транспортируют клинические образцы в лабораторию, должны быть обучены практике безопасного обращения с биоматериалом,

строго соблюдать меры предосторожности и использовать средства индивидуальной защиты (СИЗ).

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность вирусом Зика, проводят в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13).

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

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

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

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;

- 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.

14) информация о предназначении изделия для одноразового использования

Набор реагентов предназначен для дробного одноразового использования.

15) информация о надлежащей обработке изделия для его повторного использования, включая очистку, дезинфекцию, упаковку и, при необходимости, метод повторной стерилизации (если медицинское изделие предназначено для многоразового использования)

Не применимо.

16) специальные требования в отношении помещений, специальной подготовки или особой квалификации пользователя и (или) третьих лиц

Допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, прошедший обучение по ПЦР-диагностике, а также лаборант со средним специальным медицинским образованием).

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением действующих правил и нормативов.

17) информация об условиях, необходимых для сбора, обработки и подготовки образцов, данные по стабильности анализируемых образцов, в том числе условия и длительность хранения, условия транспортировки, ограничения по циклам заморозки (размораживания)

ВНИМАНИЕ! Перед началом ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ЦПР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012 г.

Тип анализируемого образца

При использовании формы комплектации 1: пробы РНК, выделенных из плазмы крови.

При использовании формы комплектации 2: Клиническим материалом для исследования является непосредственно плазма крови (процедуры выделения РНК не требуется).

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

17.1 Процедура получения клинического материала

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012.

Забор клинического материала, его упаковка, маркировка и транспортировка осуществляется в соответствии с требованиями и правилами к работе с материалами, потенциально инфицированными возбудителями II группы патогенности, их хранении и транспортировки согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих МАНК при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Медицинский работник, выполняющий забор диагностического материала, его маркировку и упаковку, должен

пройти инструктаж по санитарно-эпидемиологическим требованиям и правилам биологической безопасности при работе с пациентами, потенциально инфицированными микроорганизмами II группы патогенности.

Забор материала на исследование

Взятие периферической крови проводится утром натощак в пробирку (вакуумную пробирку), содержащую раствор EDTA-K2 в качестве антикоагулянта, объёмом 4 или 6 мл. Сразу после взятия крови пробирку перевернуть 3–4 раза для перемешивания крови с раствором EDTA-K2.

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

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

Условия транспортирования и хранения исходного клинического материала – крови:

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

Кровь не замораживать.

В течение 2 часов (при хранении при комнатной температуре) или 6 часов (при хранении при температуре от +2 °С до +8 °С) после забора материала следует отобрать плазму, для чего пробирку с кровью центрифугируют при 800–1600 g в течение 20 минут при комнатной температуре. После центрифугирования верхнюю фракцию (плазму) перенести в отдельные пластиковые пробирки объёмом 1,5 или 2,0 мл, свободную от ДНКаз и РНКаз.

Условия транспортирования и хранения плазмы крови:

Допускается хранение плазмы при температуре от +2 °С до +8 °С до 5 суток, при температуре от -18 °С до -22 °С – до 3 месяцев, при температуре -70 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов плазмы.

Для выделения НК использовать не менее 100 мкл плазмы. Повышение аналитической чувствительности набора возможно

благодаря использованию большего объема плазмы, если это предусмотрено используемым набором для выделения НК, а также с помощью уменьшения объема элюции.

17.2. Подготовка клинического материала

Пробоподготовка в соответствии с используемым набором для выделения нуклеиновых кислот.

При проведении выделения нуклеиновых кислот к 100 мкл образца плазмы крови следует добавить 10 мкл ВКО.

Подготовка для формы комплектации 2 не требуется.

18) подробная информация о подготовке к использованию изделия

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

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

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа

Подготовка компонентов набора для исследования

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа РНК, ОКО, Праймер-микс, ОТ-ПЦР-буфер 5х, ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вихре в низкой скорости в течение 3-5 сек, а затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

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

Перед проведением ОТ-ПЦР необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нём с применением дезинфицирующих средств, пригодных для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20–30 минут.

19) информация, необходимая для проверки правильности установки изделия и его готовности к безопасной работе по назначению, определенному производителем

Не применимо.

20) рекомендации в отношении процедур контроля качества при необходимости

Не применимо.

21) информация о прослеживаемости значений, заданных для калибраторов или контрольных материалов, которая обеспечивается посредством доступных референтных методик (методов) измерения и (или) эталонов

Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам относительно референтного метода: для метрологической прослеживаемости положительного контрольного образца (ПКО), входящего в состав изделия, спектрофотометрическим методом проводят проверку концентрации ДНК при приготовлении ПКО с последующим проведением реакции амплификации.

22) процедура тестирования, включая расчеты и интерпретации результатов тестирования, и при необходимости информация о целесообразности проведения подтверждающих тестов;

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

А) Выделение РНК (при использовании формы комплектации 1);

Б) Проведение ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;

В) Регистрация и интерпретация результатов

А) Выделение РНК из клинического материала

(только при использовании формы комплектации 1 «ZIK-test-Classic»)

Для выделения пробы НК человека из плазмы крови рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

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

- Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009, производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/08867 от 13.10.2016 г.);

или аналогичных, предназначенных для выделения РНК из плазмы крови и обеспечивающих следующее качество выделенной РНК

- чистота выделения РНК, выраженная в отношении оптических плотностей ($A_{260/280\text{nm}}$) – не менее 1,6;

- эффективность выделения РНК – не менее 20%.

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

К каждому исследуемому образцу плазмы перед выделением следует добавить 10 мкл ВКО из набора реагентов «ZIK-test-Classic».

Образец ОКО также проходит процедуру выделения НК в объеме 100 мкл без добавления ВКО. Если инструкцией производителя набора реагентов для выделения НК предусмотрено использование большего объема образца, следует довести объем ОКО до требуемого физиологическим раствором или ТЕ-буфером.

Условия возможного хранения анализируемых образцов НК:

В соответствии с инструкцией используемого набора для выделения НК.

Б) Проведение ОТ-ПЦР РНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;

Проведение ОТ-ПЦР для формы комплектации 1 «ZIK-test-Classic»

Подготовка компонентов набора для ОТ-ПЦР

Перед приготовлением реакционных смесей необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нём, с применением дезинфицирующих средств, пригодных для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20–30 минут.

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа РНК, ОТ-ПЦР-буфером 5х, Праймер-миксом, ОКО прошедшим этап выделения, ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

2. Отобрать необходимое количество пробирок (с оптически прозрачными крышками или стенками – в зависимости от используемого типа детектирующего амплификатора) объёмом 0,1 или 0,2 мл для ПЦР из следующего расчёта: количество исследуемых образцов + ПКО + ОКО.

Для приготовления реакционной смеси необходимо:

1. ОТ-ПЦР-буфер 5х – 5 мкл,
 2. Праймер-микс – 5 мкл,
 3. Образец (исследуемый образец РНК, ПКО, ОКО) – 15 мкл.
- Общий объём реакции – 25 мкл.**

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакций.

Протокол проведения ОТ-ПЦР

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл для ПЦР.

2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: $(n+3) \times 5$ мкл ПЦР-буфера $5 \times (n+3) \times 5$ мкл праймер-микса, где n – количество исследуемых образцов. Тщательно перемешать реакционную смесь в течение 3–5 с на вортексе.

3. В соответствующие приготовленные пробирки для ПЦР внести по 10 мкл реакционной смеси.

4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 15 мкл выделенной РНК. В пробирки для ПКО и ОКО препарат РНК не вносится.

5. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ПКО.

6. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ОКО, прошедшего этап выделения НК.

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

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

9. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора (таблица 4).

Таблица 4 – Протокол ОТ-ПЦР

Стадия	Температура, °С	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	52	25:00	–	–
2	95	02:00	–	–
3	95	00:15	–	5
	64	00:20		
4	95	00:15	–	45
	64	00:20	FAM/Green, HEX/Yellow	

Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

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

11. Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

12. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

Проведение ОТ-ПЦР для формы комплектации 2 «ZIK-test- Cito»

Подготовка компонентов набора для ОТ-ПЦР

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с подготовленным клиническим материалом, ОКО, ОТ-ПЦР-буфером-Cito 5x, ВКО, Праймер-миксом и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, а затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

2. Отобрать необходимое количество пробирок объёмом 0,1–0,2 мл для проведения реакции ОТ-ПЦР из расчёта на количество исследуемых образцов, ПКО и ОКО.

Перед приготовлением реакций необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нём с применением дезинфицирующих средств, пригодных для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20–30 минут.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции. При изменении объёма чувствительность метода резко снижается!

Для проведения одной реакции необходимо:

Для приготовления реакционной смеси необходимо:

1. ОТ-ПЦР-буфер-Cito 5x – 5 мкл,
2. Праймер-микс – 5 мкл,
3. Образец (исследуемый образец – 5 мкл с добавлением 10 мкл ВКО, образец ПКО или образец ОКО) – 15 мкл.
4. **Общий объём реакции – 25 мкл.**

Протокол проведения ОТ-ПЦР

Готовить реакционные пробирки необходимо согласно таблице 5 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1–0,2 мл для ОТ-ПЦР по одной для каждого исследуемого образца², одну пробирку для ПКО и одну пробирку для ОКО.

Таблица 5 – Пример расположения пробирок и внесения компонентов для проведения ПЦР

Компонент	Образец 1		Образец 2		Контроли	
	повторы		повторы		ПКО	ОКО
ОТ-ПЦР-буфер-Cito 5х, мкл	5	5	5	5	5	5
Праймер-микс, мкл	5	5	5	5	5	5
Образец, мкл	5	5	5	5	-	-
ВКО, мкл	10	10	10	10	-	-
ПКО, мкл	-	-	-	-	15	-
ОКО, мкл	-	-	-	-	-	15

2. Внести в каждую пробирку по 5 мкл ОТ-ПЦР-буфера-Cito 5х.

3. Внести в каждую пробирку по 5 мкл Праймер-микса.

4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 5 мкл образца. В пробирки для ПКО и ОКО образец не вносится.

5. Внести в соответствующие пробирки по 10 мкл ВКО. В пробирки для ПКО и ОКО внутренний контрольный образец не вносится.

6. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ПКО.

7. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ОКО.

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

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

² Для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец в двух повторах.

10. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ОТ-ПЦР указан в таблице 4.

11. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

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

13. Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

14. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

В) Регистрация и интерпретация результатов

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

Рекомендации по установке пороговой линии

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

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t каналов FAM/Green и HEX/Yellow (табл. 1). Учитываются только значения C_t , полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 4 – см. табл. 4).

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

В случае использования амплификаторов Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene Q и аналогичных, активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal).

В случае использования амплификатора CFX96 (BioRad) для коррекции базовой линии выберите диапазон анализа Ct от 5 до 45 либо от 10 до 45 цикла.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (таблица 6).

Таблица 6 – Результаты исследования для ПКО и ОКО

Внесенный материал	Выбранный флуорофор	
	FAM (РНК вируса Зика)	HEX (ВКО)
ОКО	> 40 или отс.	> 40 или отс.
ПКО	$Ct \leq 30$	$Ct \leq 32$

Обозначения: «отс.» – значение Ct отсутствует.

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах РНК

Анализ результатов при проведении качественного анализа представлен в таблице 7.

Таблица 7 – Принцип интерпретации результатов

Значение порогового цикла (Ct) по каналам		Результат
FAM	HEX	
Отсутствует	$Ct \leq 32$	РНК вируса Зика не обнаружена
$Ct \leq 40$	не учитывается ³	РНК вируса Зика обнаружена
$Ct > 40$ или отсутствует	$Ct > 32$ или отсутствует	Результат невалидный
$Ct > 40$	$Ct \leq 32$	Результат сомнительный

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

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

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

23) Характеристики аналитической эффективности

23.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к РНК вируса Зика.

Показано отсутствие кросс-реактивности *in vitro*: Чикунгунья, Денге (1-4 типа), вирус иммунодефицита человека 1 (HIV-1), вирус иммунодефицита человека 2 (HIV-2), гепатит В (HBV), гепатит С (HCV), гепатит D (HDV), *Plasmodium*; *in silico*: *Bartonella quintana*, *B. henselae*, *Borrelia bisetti*, *B. garinii*, *B. japonica*, *B. spielmanii*, *Coxiella burnetii*, *Dobrava-Belgrade orthohantavirus*, *Japanese Encephalitis virus*, *Leptospira interrogans*, *L. kirshneri*, *L. borgpetersenii*, *Puumala orthohantavirus*, *Rickettsia conorii*, *R.*

³ При высоких концентрациях РНК вируса Зика выход по каналу HEX может происходить на поздних циклах или отсутствовать.

hejlonjiangensis, Tick Borne Encephalitis Virus (TBEV), *Treponema pallidum*, *Trypanosoma cruzi*, West Nile virus, and Yellow Fever virus.

23.2 Аналитическая чувствительность

Форма комплектации 1: не менее 500 копий РНК вируса Зика на 1 мл клинического материала.

Форма комплектации 2: не менее 1 000 копий РНК вируса Зика на 1 мл клинического материала

23.3 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости положительный контрольный образец и внутренний контрольный образец были исследованы по двум канал флуоресценции (FAM, HEX) 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 5%.

23.4 Прецизионность в условиях воспроизводимости

Оценку воспроизводимости тест-системы проводят аналогично расчёту прецизионности в условиях повторяемости (раздел 23.2), 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 внутривыставочная, межвыставочная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 5%.

23.5 Предел обнаружения (детекции)

Форма комплектации 1: не менее 500 копий РНК вируса Зика на 1 мл клинического материала.

Форма комплектации 2: не менее 1 000 копий РНК вируса Зика на 1 мл клинического материала

24) Характеристики клинической эффективности: диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность

Вид исследуемого материала	Количество наблюдений	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность	Доверительный Интервал с доверительной вероятностью 95 %
Плазма крови		100%	100%	

25) Биологический референтный интервал

Не применимо.

26) информация об интерферирующих веществах или ограничениях, связанных с пробой, которые могут повлиять на результат исследования

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «ZIK-test» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые будут встречаться при процедуре забора клинического материала в следующих концентрациях:

для формы комплектации 1:

Интерферирующие вещества:

- гемоглобин – 10%;
- гепарин (антикоагулянт) – 0,15 МЕ/мл;
- цитрат натрия (антикоагулянт) – 0,1 мМ/мл;
- EDTA-K2 (антикоагулянт) – 0,5 мМ/мл;
- холестерин – 150 мг/дл;
- триглицериды – 250 мг/дл;

для формы комплектации 2:

- гемоглобин – 0,1%;
- гепарин (антикоагулянт) – 0,0015 МЕ/мл;
- цитрат натрия (антикоагулянт) – 0,1 мМ/мл;
- EDTA-K2 (антикоагулянт) – 0,5 мМ/мл;

- холестерин – 150 мг/дл;
- триглицериды – 250 мг/дл.

На основании результатов исследования потенциально интерферирующие вещества, встречающиеся при процедуре выделения РНК из клинического материала, оцениваемые при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «ZIK-test», не оказывают влияние на результат анализа.

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, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

27) предупреждение и (или) специальные меры предосторожности в отношении безопасной утилизации изделия и принадлежностей (при наличии)

Изделия в процессе хранения и транспортирования не выделяют вредных веществ, загрязняющих окружающую среду. Отходы, образующиеся в результате применения набора реагентов по назначению, установленному производителем, а также не использованные изделия (истекший срок годности, поврежденная потребительская упаковка/маркировка, поврежденная упаковка/маркировка реагентов и т.д.) относятся к медицинским отходам.

Медицинские отходы подлежат сбору, обезвреживанию, размещению, хранению, транспортировке, учету и утилизации в соответствии с действующими правилами и нормативами.

Потребительская упаковка набора реагентов «ZIK-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.

28) в отношении изделия , предназначенного для самотестирования пользователем или тестирования вблизи пользователя

Не применимо.

29) данные о выпуске или последнем пересмотре инструкции по применению

Версия 1 от 11.05.2024

30) информация о необходимости направления сообщения производителю или его уполномоченному представителю о нежелательных событиях, которые имеют признаки неблагоприятного события (инцидента).

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

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

432072 Россия

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

Символы маркировки

Символ	Наименование символа
	Использовать до
	Дата изготовления
	Код партии
	Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для 94 определений