



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

**Инструкция
по медицинскому применению медицинского изделия
для диагностики *in vitro***

**Набор реагентов для качественного выявления
ДНК/РНК видов *Plasmodium*:
P. falciparum, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale***

«*Plasmodium*-species-тест»

1) Наименование и (или) торговое наименование медицинского изделия для диагностики in vitro

Набор реагентов для качественного выявления и дифференциации нуклеиновых кислот видов рода *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale* методом ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ «*Plasmodium*-species-тест»

Сокращенное наименование – набор реагентов «*Plasmodium*-species-тест».

2) Сведения о производителе медицинского изделия для диагностики in vitro

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

432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й пр-д, д. 9, оф. 13

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

3) Назначение медицинского изделия для диагностики in vitro

Назначение: набор реагентов «*Plasmodium*-species-тест» предназначен для качественного выявления и дифференциации нуклеиновых кислот видов рода *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale* (включая *P. ovale curtisi* и *P. ovale wallikeri*) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) или ОТ-ПЦР-РВ – то есть совмещённой с этапом одностадийной обратной транскрипции – в клинических пробах с целью диагностики малярии у пациентов с клинической симптоматикой заболевания.

Функциональное назначение – полученные результаты могут использоваться для поддержки диагностики малярии, вызванной видами рода *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale* (включая *P. ovale curtisi* и *P. ovale wallikeri*).

Описание того, что определяется и (или) измеряется (аналит) – высокоспецифичные участки ДНК/РНК – фрагмент гена, кодирующего 18S рРНК, или 18S рРНК.

Специфическое расстройство, состояние или фактор риска для обнаружения, определения или дифференцирования которого предназначено медицинское изделие для диагностики in vitro – набор реагентов «*Plasmodium-species-тест*» предназначен для качественного выявления и дифференциации нуклеиновых кислот видов рода *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale* (включая *P. ovale curtisi* и *P. ovale wallikeri*) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) или ОТ-ПЦР-РВ – то есть совмещённой с этапом одностадийной обратной транскрипции – в клинических пробах с целью диагностики малярии у пациентов с клинической симптоматикой заболевания.

Предназначение медицинского изделия для диагностики in vitro для качественных, полуколичественных или количественных определений – набор реагентов «*Plasmodium-species-тест*» предназначен для качественного выявления нуклеиновых кислот.

Тип анализируемого образца – в зависимости от формы комплектации:

форма комплектации 1: ДНК, выделенная из цельной крови человека;

форма комплектации 2: РНК, выделенная из цельной крови человека.

Показания к применению: набор реагентов «*Plasmodium-species-тест*» рекомендуется к применению у пациентов с клинической симптоматикой малярии, подозрительного на инфекцию, вызванную представителями рода *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale* (включая *P. ovale curtisi* и *P. ovale wallikeri*).

Противопоказания к применению: отсутствуют.

4) Набор реагентов «*Plasmodium-species-тест*» предназначен для диагностики in vitro для клинической лабораторной диагностики.

5) Потенциальный потребитель медицинского 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

Для формы комплектации 1: мультиплексная полимеразная цепная реакция с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Для формы комплектации 2: одностадийная обратная транскрипция – мультиплексная полимеразная цепная реакция с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

Принцип определения

Для формы комплектации 1: выявление нуклеиновых кислот представителей рода *Plasmodium* основано на проведении полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Для формы комплектации 2: выявление нуклеиновых кислот представителей рода *Plasmodium* основано на использовании метода одностадийной реакции обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции в реальном времени в одной пробирке.

В состав ПЦР-буфера 5х (для формы комплектации 1) входят все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты, 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 состав ОТ-ПЦР-буфера 5х (для формы комплектации 2) входят все основные реагенты, включая ревертазу с «тёплым стартом», термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим

стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты и оптимизированный буфер.

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

Набор содержит реагенты для качественного определения и дифференциации нуклеиновых кислот видов рода *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale* (включая *P. ovale curtisi* и *P. ovale wallikeri*, без дифференциации) и внутреннего контрольного образца (далее ВКО) (таблица 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору				
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red	Cy5.5 / Crimson
18S <i>Plasmodium falciparum</i>	ВКО	18S <i>Plasmodium vivax</i>	18S <i>Plasmodium malariae</i>	18S <i>Plasmodium ovale</i>

Внутренний контрольный образец (ВКО) позволяет выявить наличие ингибиторов в анализируемой пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам и/или оценить эффективность выделения нуклеиновых кислот.

Общее время проведения анализа составляет 55–75 минут для формы комплектации 1 и 80–100 минут для формы комплектации 2 в зависимости от используемой модели амплификатора (без учёта 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 «*Plasmodium-species*-тест-ДНК».

2) Форма комплектации 2

3) Состав: комплект реагентов для ОТ-ПЦР «*Plasmodium-species*-тест-РНК».

Количество анализов

Наборы реагентов «*Plasmodium-species*-тест» 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 «*Plasmodium-species*-тест-ДНК», форма комплектации 1

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «<i>Plasmodium-species</i>-тест-ДНК»			
1.	ПЦР-буфер 5x	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2.	Смесь олигонуклеотидов	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 «*Plasmodium-species-тест-РНК*», форма комплектации 2

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «<i>Plasmodium-species-тест-РНК</i>»			
1.	ОТ-ПЦР-буфер 5x	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2.	Смесь олигонуклеотидов	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

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.

ПЦР-буфер 5x готов к использованию и содержит все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты, урацил-ДНК-гликозидазу и оптимизированный буфер. Наличие фермента урацил-ДНК-гликозидаза 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.

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

Смесь олигонуклеотидов готова к использованию и содержит праймеры и зонды, предназначенные для выявления специфических мишеней:

1. Праймеры и зонды к фрагменту 18S *Plasmodium falciparum*. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.

2. Праймеры и зонды к фрагменту 18S *Plasmodium vivax*. Детекция осуществляется по каналу ROX/Orange.

3. Праймеры и зонды к фрагменту 18S *Plasmodium malariae*. Детекция осуществляется по каналу Cy5/Red.

4. Праймеры и зонды к фрагменту 18S *Plasmodium ovale*. Детекция осуществляется по каналу Cy5.5/Crimson.

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

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и содержит выявляемые набором реагентов специфические фрагменты 18S *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale*, а также ВКО. 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 ДНКаз и РНКаз.

Внутренний контрольный образец (ВКО) готов к использованию и представляет собой препарат ДНК для формы комплектации 1 и армированную РНК для формы комплектации 2.

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 медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Работа с набором реагентов «*Plasmodium*-species-тест» осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР-РВ и/или 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 объёма (например, Eppendorf, Германия);

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

5. Амплификатор¹ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson – 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 нуклеиновыми кислотами 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;

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.

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, Axugen, США), совместимые с используемым амплификатором;

4. Халат и одноразовые перчатки без талька;

5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;

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 «Эпшендорф» на 1,5–2,0 мл,

9. Набор для выделения нуклеиновых кислот (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.)

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 нуклеиновых кислот рекомендуется использование комплектов реагентов, предназначенных для выделения из цельной крови и обеспечивающих следующее качество выделенных нуклеиновых кислот:

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

– эффективность выделения ДНК/РНК – не менее 20%.

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

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

Условия хранения

Комплект реагентов «*Plasmodium*-species-тест» (формы комплектации 1 и 2) 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 медицинского изделия для диагностики in vitro (например, условия хранения, срок годности после первого вскрытия первичного контейнера), а также условиях хранения и стабильности рабочих растворов

Хранение

Комплект реагентов «*Plasmodium*-species-тест» (формы комплектации 1, 2) 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 «*Plasmodium*-species-тест» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Комплект реагентов транспортировать при температуре от -18 °С до -22 °С в течение всего срока годности. 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 хладоэлементами. Тип, объём и количество хладоэлементов, 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 «*Plasmodium*-species-тест» – 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 истёкшим 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 медицинского изделия для диагностики in vitro)

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 3, 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 «*Plasmodium-species-тест*», 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 «*Plasmodium-species-тест*», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «*Plasmodium-species-тест*», не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

К работе с тест-системами 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 III 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 ёмкость, 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 III группы патогенности.

Перевозка образцов должна осуществляться в соответствии с

требованиями санитарного законодательства по отношению к микроорганизмам III группы патогенности.

Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». 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).

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 медицинского изделия для диагностики *in vitro* для одноразового использования

Набор реагентов предназначен для дробного одноразового использования.

15) информация о надлежащей обработке медицинского изделия для диагностики *in vitro* для его повторного использования, включая очистку, дезинфекцию, упаковку и, при необходимости, метод повторной стерилизации (если медицинское изделие для диагностики *in vitro* 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 забора клинического материала следует 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: Образцы ДНК, выделенные из цельной крови.

При использовании формы комплектации 2: Образцы РНК, выделенные из цельной крови.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

17.1 Процедура получения клинического материала

ВНИМАНИЕ! Забор диагностического материала, его упаковка, маркировка и транспортировка осуществляется в соответствии с требованиями и правилами к работе с материалами, потенциально инфицированными возбудителями II группы патогенности, их хранения 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 III группы патогенности.

Забор материала на исследование

Взятие периферической крови проводится утром натощак в пробирку (вакуумную пробирку), содержащую раствор ЭДТА, объемом 4 или 6 мл. Использование гепарина в качестве антикоагулянта не допускается. Сразу после взятия крови пробирку перевернуть 3–4 раза для перемешивания крови с ЭДТА.

Условия транспортирования и хранения клинического материала:

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

Транспортировка герметично закрытых контейнеров с образцами в лабораторию осуществляется в специальных контейнерах/биксах. Направления и другая документация на бумажных носителях передается в отдельном полиэтиленовом пакете.

При необходимости пересылки образцов в лабораторию другого медицинского учреждения выполняются требования к пересылке инфекционных материалов III группы патогенности (СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности»).

Пробирки/контейнеры с образцами вместе с крышкой герметизируют различными пластификаторами (парафин, парафильм и др.); ёмкость маркируют. Образцы каждого пациента помещают в индивидуальный герметичный пакет с адсорбирующим материалом и дополнительно упаковывают в общий герметичный пакет.

Два или более образца одного пациента могут быть упакованы в один пластиковый пакет. Запрещается упаковывать

образцы клинического материала от разных людей в одну упаковку.

Пакет с контейнерами помещают в герметично закрывающийся контейнер для транспортировки биологических материалов. Контейнер помещают в пенопластовый термоконтейнер с охлаждающими термоэлементами. Транспортный контейнер печатывается и маркируется. В контейнер желательно поместить одноразовый индикатор, контролирующий соблюдение температуры от +2° до +8 °С.

Сопроводительные документы помещаются в индивидуальную упаковку отдельно от биологического материала и прочно прикрепляются снаружи контейнера.

17.2. Подготовка клинического материала²

Пробоподготовка в соответствии с используемым набором для выделения нуклеиновых кислот.

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

18) подробная информация о подготовке к использованию медицинского изделия для диагностики *in vitro*

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

ВНИМАНИЕ! При работе с нуклеиновыми кислотами необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free» и «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 выделенным для анализа препаратом нуклеиновых кислот, ОКО,

² МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». М.: 2009 г.

смесью олигонуклеотидов, ПЦР-буфером 5х или ОТ-ПЦР-буфером 5х (в зависимости от формы комплектации), 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 стрипов или пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов.

Перед проведением ПЦР/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 медицинского изделия для диагностики *in vitro* 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) Проведение ПЦР-РВ / ОТ-ПЦР-РВ с образцами нуклеиновых кислот с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени.
- Б) Регистрация и интерпретация результатов.

А) Проведение ПЦР / ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени

Проведение ПЦР / ОТ-ПЦР для форм комплектации 1 и 2 «*Plasmodium-species*-тест»

Подготовка компонентов набора

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 ДНК/РНК, ПЦР-буфером 5х или ОТ-ПЦР-буфером 5х, смесью олигонуклеотидов, ОКО, ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на микроцентрифуге-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. ПЦР-буфер 5х (форма комплектации 1) или ОТ-ПЦР-буфер 5х (форма комплектации 2) – 5 мкл,
- 2. Смесь олигонуклеотидов – 5 мкл,
- 3. Образец (исследуемый образец ДНК/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 «Эпшендорф» объёмом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: $(n+3) \times 5$ мкл ПЦР-буфера 5x или ОТ-ПЦР-буфера 5x и $(n+3) \times 5$ мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов. Тщательно перемешать реакционную смесь в течение 3–5 с на микроцентрифуге-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 выделенного препарата нуклеиновых кислот. В пробирки для ПКО и ОКО препарат нуклеиновых кислот 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 ПЦР/ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора (таблицы 4–5 – для разных форм комплектаций). При необходимости одновременной постановки реакций формы комплектации 1 с другими наборами реагентов, требующими этап обратной транскрипции, допустимо к протоколу Таблицы 4 добавить начальный этап «52°C – 25 минут», что не

повлияет на аналитические и диагностические характеристики набора реагентов.

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификатора QuantStudio 5 необходимо произвести настройку оптических фильтров до запуска протокола амплификации (возможна регистрация сигнала VIC каналом ROX в случае $\Delta Rn > 100\ 000$, что может привести к получению ложноположительных результатов)! Для этого в закладке «Method» нажать кнопку «Action», после чего в сплывающем меню выбрать «Optical filter settings», где в разделе «PCR Filter» оставить только следующие комбинации фильтров: x1 – m1, x2 – m2, x4 – m4, x5 – m5, x6 – m6.

Таблица 4 – Протокол ПЦР (для формы комплектации 1, «*Plasmodium-species*-тест-ДНК»)

Стадия	Температура, °С	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	02:00	–	–
2	95	00:15	–	5
	64	00:20		
3	95	00:15	–	45
	64	00:20	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson	

Таблица 5 – Протокол ПЦР (для формы комплектации 2, «*Plasmodium-species-тест-РНК*»)

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	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson	45
	64	00:20		

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, ROX/Orange, Cy5/Red и Cy5.5/Crimson.

11. Запустить ПЦР/ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

12. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

Б) 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 *Ct* каналов FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red и Cy5.5/Crimson. Учитываются только значения *Ct*, полученные на

стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 3 – см. таблицу 4 или стадии 4 – см. таблицу 5).

Сначала оценивают прохождение реакции и значения Ct 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).

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

Контрольный образец	Выбранный флуорофор				
	FAM / Green (<i>P. falciparum</i>)	HEX / Yellow (BKO)	ROX / Orange (<i>P. vivax</i>)	Cy5 / Red (<i>P. malariae</i>)	Cy5.5 / Crimson (<i>P. ovale</i>)
ОКО	> 35 или отс.	> 35 или отс.	> 35 или отс.	> 35 или отс.	> 35 или отс.
ПКО	Ct ≤ 30	Ct ≤ 32	Ct ≤ 30	Ct ≤ 30	Ct ≤ 30

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 ДНК

Анализ результатов при проведении качественного анализа представлен в таблице 7.

Таблица 7 – Принцип интерпретации результатов

Значение порогового цикла (Ct) по каналам					Результат	
FAM / Green	ROX / Orange	Cy5 / Red	Cy5.5 / Crimson	HEX / Yellow		
<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	ВКО		
отс.					Ct ≤ 32	НК <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> и <i>P. ovale</i> не обнаружена
Ct ≤ 35					не уч.	Обнаружена НК, соответствующая каналу*
Ct > 35 или отс.					Ct > 32 или отс.	Результат невалидный
Ct > 35					Ct ≤ 32	Результат сомнительный

Обозначения: «НК» – нуклеиновая кислота (ДНК для формы комплектации 1 и РНК+ДНК для формы комплектации 2); «отс.» – значение Ct отсутствует; «не уч.» – значение Ct не учитывается.

Примечание: * – при нахождении НК *P. vivax* (канал ROX/Orange) возможно срабатывание каналов Cy5/Red и Cy5.5/Crimson. Значения по Cy5/Red и Cy5.5/Crimson не учитываются в случае, если $Ct_{Cy5} - Ct_{ROX} > 1,5$ и $Ct_{Cy5.5} - Ct_{ROX} > 1,5$.

23) Характеристики аналитической эффективности

23.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к 18S видов рода *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale*.

23.2 Аналитическая чувствительность

Для формы комплектации 1: не менее 500 МЕ ДНК *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale* (включая подвиды *P. ovale curtisi* и *P. ovale wallikeri*) на 1 мл клинического материала.

Для формы комплектации 2: не менее 500 МЕ РНК *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale* (включая

подвиды *P. ovale curtisi* и *P. ovale wallikeri*) на 1 мл клинического материала, включая подвиды

Показано отсутствие кросс-реактивности *in vitro*: Chikungunya virus, Dengue 1 virus, Dengue 2 virus, Dengue 3 virus, Dengue 4 virus, Zika virus, human immunodeficiency virus 1 (HIV-1), human immunodeficiency virus 2 (HIV-2), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), hepatitis D virus (HDV); *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. hejlonjiangensis*, Tick Borne Encephalitis Virus (TBEV), *Treponema pallidum*, *Trypanosoma cruzi*, West Nile virus, and Yellow Fever virus.

23.3 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости положительный контрольный образец и внутренний контрольный образец были исследованы по пяти канал флуоресценции (FAM, HEX, ROX, Cy5 и Cy5.5) 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 внутриспоровочная, межспоровочная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 5%.

23.5 Предел обнаружения (детекции)

Для формы комплектации 1: не менее 500 МЕ ДНК *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale* на 1 мл клинического материала.

Для формы комплектации 2: не менее 500 МЕ РНК *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale* 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 %
Кровь		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 «*Plasmodium*-species-тест» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые будут встречаться при процедуре забора клинического материала в следующих концентрациях:

- гемоглобин – 10%;
- гиалуроновая кислота – 5%;
- «Ибупрофен» – 0,04 мг/мл;
- «Амбробене» – 0,003 мг/мл;

- «Бромгексин» – 0,016 мг/мл;
- «Калетра» – 0,02 мг/мл;
- «Интерферон» – 0,2 ед./мл;
- Терафлю» – 0,071 мг/мл.

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 «*Plasmodium*-species-тест», 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 медицинского изделия для диагностики *in vitro* 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 (истёкший срок годности, повреждённая потребительская упаковка/маркировка, повреждённая упаковка/маркировка реагентов и т.д.) относятся к медицинским отходам.

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

Потребительская упаковка набора реагентов «*Plasmodium*-species-тест» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

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

28) в отношении медицинского изделия для диагностики in vitro, 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