



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 количественного выявления
ДНК *Plasmodium* spp.
«*Plasmodium*-тест-Q»**

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

Набор реагентов для количественного выявления ДНК видов рода *Plasmodium* методом ПЦР-РВ «*Plasmodium*-тест-Q».

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

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*-тест-Q» предназначен для количественного выявления ДНК всех клинически значимых представителей рода *Plasmodium*, включая *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri* и *P. knowlesi*, без их дифференциации, методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в клинических пробах с целью диагностики малярии у пациентов с клинической симптоматикой заболевания и определения концентрации возбудителя – *Plasmodium* sp. в крови пациента.

Функциональное назначение – полученные результаты могут использоваться для поддержки диагностики малярии и терапии заболевания.

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

Специфическое расстройство, состояние или фактор риска для обнаружения, определения или дифференцирования которого предназначено медицинское изделие для диагностики *in vitro* – набор реагентов «*Plasmodium*-тест-Q» предназначен для

количественного выявления ДНК клинически значимых представителей рода *Plasmodium*, включая *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri* и *P. knowlesi*, без их дифференциации, методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в клинических пробах с целью диагностики малярии у пациентов с клинической симптоматикой заболевания и определения концентрации возбудителя – *Plasmodium* sp. в крови пациента.

Предназначение медицинского изделия для диагностики in vitro для качественных, полуколичественных или количественных определений – набор реагентов «*Plasmodium*-тест-Q» предназначен для количественного выявления ДНК *Plasmodium* sp. в крови пациента.

Тип анализируемого образца: препарат ДНК, полученный из цельной крови человека.

Показания к применению: набор реагентов «*Plasmodium*-тест-Q» рекомендуется к применению у пациентов с клинической симптоматикой малярии, подозрительного на инфекцию, вызванную представителями рода *Plasmodium*.

Противопоказания к применению: отсутствуют.

4) Набор реагентов «*Plasmodium*-тест-Q» 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

Мультиплексная полимеразная цепная реакция с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Принцип определения

Выявление нуклеиновых кислот представителей рода *Plasmodium* основано на проведении полимеразной цепной реакции в реальном времени.

В состав ПЦР-буфера 5х 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 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 тушитель, 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 количественного определения ДНК представителей рода *Plasmodium*, включая *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri* и *P. knowlesi* (без дифференциации), и внутреннего контрольного образца (далее ВКО) (таблица 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору	
FAM / Green	HEX / Yellow
18S <i>Plasmodium</i> spp.	ВКО

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 в зависимости от используемой модели амплификатора (без учёта пробоподготовки).

7) Описание реагентов, калибраторов и контрольных материалов

Варианты исполнения

Набор реагентов выпускается в одном варианте комплектации: «*Plasmodium*-тест-Q».

Количество анализов

Набор реагентов «*Plasmodium*-тест-Q» (таблица 2) рассчитан на 96 реакций, что соответствует определению 90 исследуемых образцов, отрицательных и положительных контрольных образцов при единичном запуске амплификатора на 96 лунок или 13 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами и калибраторами в каждой постановке.

Состав набора

Таблица 2 – Состав набора реагентов «*Plasmodium*-тест-Q»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1.	ПЦР-буфер 5х	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, 195 мкл
4.	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1300 мкл
5.	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 920 мкл
6.	КО-1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1300 мкл
7.	КО-2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1300 мкл

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

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

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

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

2. 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* spp., 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.

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

Калибровочный образец № 1 (КО-1) представляет собой препарат ДНК, содержащий амплифицируемый фрагмент геномной ДНК *Plasmodium* spp. с концентрацией 1×10^6 МЕ/мл.

Калибровочный образец № 2 (КО-2) представляет собой препарат ДНК, содержащий амплифицируемый фрагмент геномной ДНК *Plasmodium* spp. с концентрацией 5×10^3 МЕ/мл.

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*-тест-Q» осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной 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 °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 и 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 нуклеиновыми кислотами 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, 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 объёмом 0,1 или 0,2 мл, или пробирки для ПЦР объёмом 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;
6. Штативы «рабочее место» для пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл (например, ООО «ИнтерЛабСервис», Россия);
7. Штативы для пробирок объёмом 1,5 мл и наконечников,

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.

8. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» 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 необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-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*-тест-Q» 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*-тест-Q» 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*-тест-Q» 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 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 «*Plasmodium*-тест-Q» – 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*-тест-Q», 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*-тест-Q», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «*Plasmodium*-тест-Q», 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

Образцы ДНК, 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.

Через этап выделения проходят также калибровочные образцы КО-1 и КО-2 в объёме 100 мкл с добавлением 10 мкл ВКО, а также ОКО без добавления ВКО.

Если инструкцией производителя наборов реагентов для выделения ДНК предусмотрено использование большего объёма образца, следует довести объём ОКО, КО-1 и КО-2 до требуемого физиологическим раствором или ТЕ-буфером.

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК: согласно инструкции используемого набора для выделения.

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». 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, смесью олигонуклеотидов, ПЦР-буфером 5х, ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой

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.

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 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 с образцами нуклеиновых кислот с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени.

Б) Регистрация и интерпретация результатов.

А) Проведение ПЦР

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, ПЦР-буфером 5х, смесью олигонуклеотидов, ОКО, КО-1, КО-2, 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. Образцы ОКО, КО-1 и КО-2 – прошедшие этап выделения ДНК, при этом к образцам КО-1 и КО-2 следует добавить по 10 мкл ВКО.

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: 1 х количество исследуемых образцов³ + 2 х КО-1 + 2 х КО-2 + 1 х ПКО + 1 х ОКО.

Для приготовления реакционной смеси необходимо:

1. ПЦР-буфер 5х – 5 мкл,
2. Смесь олигонуклеотидов – 5 мкл,
3. Образец (исследуемый образец, ПКО, КО-1, КО-2 и ОКО) – 15 мкл.

Общий объём реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакций.

³ Для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец в двух повторах.

Протокол проведения 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: $(n+8) \times 5$ мкл ПЦР-буфера 5х и $(n+8) \times 5$ мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов. Тщательно перемешать реакционную смесь в течение 3–5 секунд 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 без добавления ВКО.
 7. Внести в соответствующие 2 пробирки по 15 мкл КО-1, прошедшего этап выделения с добавлением ВКО.
 8. Внести в соответствующие 2 пробирки по 15 мкл КО-2, прошедшего этап выделения с добавлением ВКО.
 9. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.
 10. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.
 11. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора (таблица 3). Тип анализа: количественный со стандартами.
- При необходимости одновременной постановки реакций с другими наборами реагентов, требующими этап обратной транскрипции, допустимо к протоколу таблицы 3 добавить

начальный этап «52°C – 25 минут», что не повлияет на аналитические и диагностические характеристики набора реагентов.

Таблица 3 – Протокол ПЦР

Стадия	Температура, °C	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	

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 и HEX/Yellow.

13. Запустить ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

14. 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 5–10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

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

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 4 – Результаты исследования для ПКО и ОКО

Контрольный образец	Выбранный флуорофор	
	FAM / Green	HEX / Yellow
ОКО	> 35 или отс.	> 35 или отс.
ПКО	Ct ≤ 30	Ct ≤ 32

Обозначения: «отс.» – значение Ct отсутствует.

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 4, 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 4, 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

Интерпретация результатов проводится автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого вместе с используемым детектирующим амплификатором, или вручную.

На основании полученных значений C_t для калибровочных образцов и их концентраций (КО-1: 10^6 МЕ/мл; КО-2: 5×10^3 МЕ/мл) необходимо произвести построение калибровочной прямой. Для образцов учитываются значения по FAM $C_t \leq 35$. При получении для образцов значения $C_t > 35$ (при значении C_t у ВКО ≤ 32), результат считается сомнительным.

Эффективность ПЦР должна быть в диапазоне 90–110% разница между значениями C_t у повторов каждого калибровочного образца, КО-1 и КО-2, должна быть не более 2. В противном случае необходимо заново провести анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

Если для экстракции ДНК использовался объём крови, превышающий 100 мкл (при сохранении объёма калибровочных образцов, взятых для выделения ДНК), следует произвести пересчёт полученной концентрации: умножить полученное значение концентрации на соотношение $100/V$, где V – используемый объём крови для выделения ДНК.

Дальнейшие принципы интерпретации результатов отражены в таблице 5. Точность измерений концентраций: $\pm 0,5 \lg$ концентрации.

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

Причиной получения сомнительного и отрицательного результата может служить недостаточная концентрация ДНК в клиническом образце.

В случае невалидного и сомнительного результата заключение не выдаётся, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ. При этом для сомнительных результатов рекомендуется проведение выделения ДНК из большего объёма крови.

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

Таблица 5 – Принцип интерпретации результатов

Каналы, соответствующие флуорофорам		Интерпретация результата
FAM / Green (<i>Plasmodium</i> spp.), МЕ/мл	HEX / Yellow (ВКО), Ct	
$10^3 - 10^7$	не уч.	указывается конкретная концентрация в МЕ/мл крови
$< 10^3$	не уч.	указывается «менее 1000 МЕ/мл»
$> 10^7$	не уч.	указывается «более 10^7 МЕ/мл»
отс.	≤ 32	отрицательный результат (концентрация не указана)
отс.	отс.	невалидный результат

Обозначения: «отс.» – значение Ct отсутствует; «не уч.» – значение Ct не учитывается.

23) Характеристики аналитической эффективности

23.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к 18S видов рода *Plasmodium*, включая *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (подвиды *curtisi* и *wallikeri*) и *P. knowlesi*.

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

23.2 Аналитическая чувствительность

Не менее 500 МЕ/мл цельной крови ДНК *Plasmodium* spp.

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 и 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)

Не менее 500 МЕ/мл ДНК *Plasmodium* spp. Линейный диапазон определяемых концентраций: $10^3 - 10^7$ МЕ/мл.

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*-тест-Q» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые будут встречаться при процедуре забора клинического материала в следующих концентрациях:

- гемоглобин – 10%;
- гиалуриновая 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 ДНК из клинического материала, оцениваемые при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «*Plasmodium*-тест-Q», 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*-тест-Q» 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 90 определений