



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 РНК
вируса Денге методом ОТ-ПЦР-РВ
«DENV-test»

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

Набор реагентов для качественного выявления РНК вируса Денге методом ОТ-ПЦР-РВ «DENV-test»

Сокращенное наименование – набор реагентов «DENV-test».

2) Сведения о производителе медицинского изделия для диагностики in vitro

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 медицинского изделия для диагностики in vitro

Назначение: набор реагентов «DENV-test» предназначен для качественного выявления специфичных участков геномной РНК вируса Денге (1-4 типа) 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 Денге.

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

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

Лихорадка Денге – 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 для диагностики in vitro – набор реагентов «DENV-test» предназначен для

качественного выявления РНК методом одностадийной обратной транскрипции – мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) с целью диагностики лихорадки Денге, вызванной вирусом Денге (DENV).

Предназначение медицинского изделия для диагностики in vitro для качественных, полуколичественных или количественных определений – набор реагентов «DENV-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 «DENV-test» рекомендуется к применению у пациентов с клинической симптоматикой вирусного заболевания, подозрительного на инфекцию, вызванную вирусом Денге.

Противопоказания к применению: отсутствуют.

4) Набор реагентов «DENV-test» предназначен для диагностики in vitro для клинической лабораторной диагностики.

5) Потенциальный потребитель медицинского изделия

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-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 Денге 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 5x 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-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 РНК вируса Денге и фрагмента РНК внутреннего контрольного образца (далее ВКО): продукты амплификации вируса Денге 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 Денге	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 «DENV-test-Classic».

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

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

Количество анализов

Наборы реагентов «DENV-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 «DENV-test-Classic», форма комплектации 1

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «DENV-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 «DENV-test-Cito», форма комплектации 2

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «DENV-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 5x 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 5x 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 Денге. 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 Денге и внутреннего контрольного образца. ПКО находится в ТЕ-буфере (10 mM Трис, 1 mM 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 медицинского изделия для диагностики *in vitro*

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 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, 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, Axygen, 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, Axygen, США), совместимые с используемым амплификатором;

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.

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,
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}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 медицинским изделием *in vitro*

Условия хранения

Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «DENV-test-Classic» (форма комплектации 1) и комплект реагентов для ОТ-ПЦР «DENV-test-Cito» (форма комплектации 2), входящие в состав набора «DENV-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 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 для ОТ-ПЦР «DENV-test-Classic» (форма комплектации 1) и комплект реагентов для ОТ-ПЦР «DENV-test-Cito» (форма комплектации 2), входящие в состав набора «DENV-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 «DENV-test» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «DENV-test-Classic» (форма комплектации 1) и комплект реагентов для ОТ-ПЦР «DENV-test-Cito» (форма комплектации 2), входящие в состав набора «DENV-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 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 «DENV-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 медицинского изделия для диагностики *in vitro*)

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 «DENV-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 «DENV-test», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

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

К работе с тест-системами для диагностики лихорадки Денге 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 Денге, 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 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 ознакомьтесь 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, объемом 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 объемом 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 медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского 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 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 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) Выделение РНК (при использовании формы комплектации

1);

Б) Проведение ОТ-ПЦР с гибридационно-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 «DENV-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 НК

- 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 «DENV-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 объёма образца, следует довести объём 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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;

Проведение ОТ-ПЦР для формы комплектации 1 «DENV-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» объёмом 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 «DENV-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 5x, 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 5x.

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.

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

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.

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 Ct каналов FAM/Green и HEX/Yellow (табл. 1). Учитываются только

значения Ct, полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 4 – см. табл. 4).

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).

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 7).

Таблица 6 – Результаты исследования для ПКО и ОКО

Внесенный материал	Выбранный флуорофор	
	FAM (РНК вируса Денге)	HEX (ВКО)
ОКО	> 40 или отс.	> 40 или отс.
ПКО	Ct ≤ 30	Ct ≤ 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 ≤32	РНК вируса Денге не обнаружена
Ct ≤40	не учитывается ³	РНК вируса Денге обнаружена
Ct >40 или отсутствует	Ct >32 или отсутствует	Результат невалидный
Ct >40	Ct ≤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 Денге (1-4 типа).

Показано отсутствие кросс-реактивности *in vitro*: Чикунгунья, Зика, 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*,

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

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.

23.2 Аналитическая чувствительность

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

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

Форма комплектации 2: не менее 1 000 копий РНК вируса Денге 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 «DENV-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 «DENV-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 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 (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 «DENV-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 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