



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

## **Инструкция**

### **Набор реагентов для количественного выявления ДНК *Plasmodium* spp. «*Plasmodium*-тест-Q»**

**Только для научно-исследовательских целей**

### **1) Наименование и (или) торговое наименование**

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**

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:** 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 изделие** – 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.

**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 научно-исследовательских целей.**

#### **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 гибридационно-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»

| №<br>пп | Название реагента      | Описание                                                 | Количество,<br>объём    |
|---------|------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1.      | ПЦР-буфер 5x           | Прозрачная<br>бесцветная жидкость                        | 1 пробирка,<br>480 мкл  |
| 2.      | Смесь олигонуклеотидов | Прозрачная жидкость<br>с возможным<br>сиреневым оттенком | 1 пробирка,<br>480 мкл  |
| 3.      | ПКО                    | Прозрачная<br>бесцветная жидкость                        | 1 пробирка,<br>195 мкл  |
| 4.      | ОКО                    | Прозрачная<br>бесцветная жидкость                        | 1 пробирка,<br>1300 мкл |
| 5.      | ВКО                    | Прозрачная<br>бесцветная жидкость                        | 1 пробирка,<br>920 мкл  |
| 6.      | КО-1                   | Прозрачная<br>бесцветная жидкость                        | 1 пробирка,<br>1300 мкл |
| 7.      | КО-2                   | Прозрачная<br>бесцветная жидкость                        | 1 пробирка,<br>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 5x** 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  $1 \times 10^6$  МЕ/мл.

**Калибровочный образец № 2 (КО-2)** представляет собой препарат ДНК, содержащий амплифицируемый фрагмент геномной ДНК *Plasmodium* spp. с концентрацией  $5 \times 10^3$  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 изделия**

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 объема (например, Eppendorf, Германия);

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

5. Амплификатор<sup>1</sup> 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

---

<sup>1</sup> 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.

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 пленкой (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 объемом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл (например, ООО «ИнтерЛабСервис», Россия);

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

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

9. Набор для выделения 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 изделием**

### **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 изделия (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 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*-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 изделия)**

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 изделия для одноразового использования**

Набор реагентов предназначен для дробного одноразового использования.

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

Не применимо.

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

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

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

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

**ВНИМАНИЕ!** Перед началом 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 материала<sup>2</sup>**

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 изделия**

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

---

<sup>2</sup> 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 изделия и его готовности к безопасной работе по назначению, определенному производителем**

Не применимо.

**20) рекомендации в отношении процедур контроля качества при необходимости**

Не применимо.

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

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

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

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

А) 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 образцов<sup>3</sup> + 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.

---

<sup>3</sup> 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  $C_t$  каналов FAM/Green и HEX/Yellow. Учитываются только значения  $C_t$ , 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:  $5 \times 10^3$  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  $\leq 32$ ), 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<br>( <i>Plasmodium</i> spp.),<br>МЕ/мл | HEX / Yellow<br>(ВКО),<br>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.                                               | $\leq 32$                    | отрицательный результат<br>(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. hejlsonjiangensis*, 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**

| <b>Вид исследуемого материала</b> | <b>Количество наблюдений</b> | <b>Диагностическая чувствительность</b> | <b>Диагностическая специфичность</b> | <b>Доверительный интервал с доверительной вероятностью 95 %</b> |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 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 изделия и принадлежностей (при наличии)**

Изделия в процессе хранения и транспортирования не выделяют вредных веществ, загрязняющих окружающую среду. Отходы, образующиеся в результате применения набора реагентов по назначению, установленному производителем, а также не использованные изделия (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 изделия, предназначенного для самотестирования пользователем или тестирования вблизи пользователя**

Не применимо.

**29) данные о выпуске или последнем пересмотре инструкции по применению**

Версия 1 от 11.05.2024

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

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

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

432072 Россия

г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13

Тел.: +7 499 705-03-75

[www.testgen.ru](http://www.testgen.ru)

**Служба технической поддержки:**

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: [help@testgen.ru](mailto: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 |