

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выявления ДНК бактерии возбудителя брюшного тифа *Salmonella enterica* серовар Тyphi методом петлевой изотермической амплификации в реальном времени (S. Typhi LAMP PS)

Содержание

1. Назначение для использования	4
1.1 Тип анализируемого образца	4
1.2 Требования в отношении подготовки пользователей	4
1.3 Целевой анализ	4
1.4 Специфическая патология	5
1.5 Предназначение МИ для клинической лабораторной диагностики	5
2. Характеристика МИ	6
2.1 Принцип метода	6
2.2 Состав набора реагентов	6
2.3 Функциональные показатели МИ	8
3. Меры предосторожности	10
3.1 Общие требования	10
3.2 Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека	12
4. Требуемое дополнительное оборудование и материалы	12
4.1 Набор реагентов не содержит реагентов для выделения ДНК. Для выделения ДНК следует использовать один из наборов:	12
4.3 Другое требуемое оборудование и материалы	12
5. Анализируемые пробы	13
5.1 Сбор, подготовка и хранение образцов	14
5.2 Выделение нуклеиновых кислот	14
6. Проведение исследования	14
6.1 Условия проведения процедуры исследования	14
6.2 Меры предотвращения контаминации	14
6.3 Требования к персоналу	15
6.4 Экстракция ДНК из исследуемого материала	15

6.5 Подготовка образцов к постановке петлевой изотермической амплификации (LAMP).....	15
6.6 Работа с программным обеспечением амплификатора.....	16
6.7 Регистрация результатов.....	18
6.8 Анализ и интерпретация результатов петлевой изотермической амплификации.....	18
6.9 Интерпретация результатов петлевой изотермической амплификации.....	19
6.10 Действия при сомнительном результате.....	20
7. Условия транспортирования и хранения МИ.....	20
7.1 Транспортирование.....	20
7.2 Хранение.....	20
8. Указания по безопасной утилизации.....	21
9. Гарантии производителя.....	21
10. Ремонт и техническое обслуживание.....	21
11. Объяснение используемых символов.....	21
12. Контактная информация для обращений.....	23
13. Информация о пересмотре настоящей Инструкции.....	24

Настоящая инструкция содержит информацию, необходимую для правильного и безопасного применения медицинского изделия (МИ) для *in vitro* диагностики «Набор реагентов для выявления ДНК бактерии возбудителя брюшного тифа *Salmonella enterica* серовар Typhi методом петлевой изотермической амплификации в реальном времени (S. Typhi LAMP PS)», разработанного и произведенного Федеральным бюджетным учреждением науки Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера).

1. Назначение для использования

Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*: качественного выявления ДНК бактерии возбудителя брюшного тифа *Salmonella enterica* серовар Typhi в препаратах нуклеиновых кислот, выделенных из биоматериала человека (фекалий, крови, мочи).

1.1 Тип анализируемого образца

Образцами исследуемого материала являются кровь, моча, фекалии.

1.2 Требования в отношении подготовки пользователей

Медицинское изделие предназначено только для профессионального применения.

К работе с МИ допускаются только специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории, в установленном государственными регулирующими органами порядке.

Организация лабораторной диагностики брюшного тифа и определение бактерионосительства *S. Typhi* осуществляется в соответствии с требованиями санитарного законодательства по работе с патогенными микроорганизмами. Лаборатории организаций, имеющие санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека той группы патогенности, которая соответствует *S. Typhi* и условия для работы (методом ПЦР или другими методами), могут организовывать работу по выявлению *S. Typhi*, пользуясь зарегистрированными в установленном государственном порядке тест-системами в соответствии с инструкцией по применению. К работе с тест-системами для выявления *S. Typhi* в лабораториях организаций допускаются специалисты, имеющие санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с возбудителями инфекционных заболеваний той группы патогенности, к которой относится *S. Typhi*.

1.3 Целевой анализ

Целевым анализом для проведения анализа методом петлевой изотермической амплификации являются молекулы ДНК, экстрагированной из исследуемого материала,

содержащие нуклеотидные последовательности, специфичные для ДНК бактерии *S. Typhi*. Вид анализа – качественный.

1.4 Специфическая патология

Брюшной тиф – это представляющая угрозу для жизни инфекция, вызываемая бактерией *S. Typhi*. Источником инфекции при брюшном тифе является человек: бактерионоситель или больной брюшным тифом. Преимущественным механизмом передачи является фекально-оральный, реализуемый пищевым, водным и контактно-бытовыми путями передачи возбудителя. *S. Typhi* обычно распространяется через загрязненные пищевые продукты или воду. После попадания в организм бактерии *S. Typhi* начинают размножаться и проникают в кровь.

Заболевания характеризуются язвенным поражением лимфатической системы тонкой кишки, бактериемией, лихорадкой, циклическим клиническим течением с выраженной интоксикацией, розеолезной сыпью на кожных покровах туловища, гепато- и спленомегалией. Более характерен запор, нежели диарея. Изъязвление пейеровых бляшек подвздошной кишки примерно в 1% случаев приводит к кишечному кровотечению и прободению кишечника с самыми неблагоприятными последствиями для больного. Выделение возбудителя с фекалиями происходит в конце первой недели лихорадки, продолжается в периоде реконвалесценции и после перенесенного заболевания в случаях формирования хронического бактерионосительства. Частота рецидивов при брюшном тифе может достигать 10–15 %. У части переболевших может сформироваться бактерионосительство, они могут стать пожизненными источниками возбудителя, причем с высоким уровнем эпидемиологической опасности.

1.5 Предназначение МИ для клинической лабораторной диагностики

Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*: качественного выявления ДНК бактерии возбудителя брюшного тифа *Salmonella enterica* серовар *Typhi* в препаратах нуклеиновых кислот, выделенных из биоматериала человека (фекалий, крови, мочи).

Используется для исследования материала, полученного от лиц больных брюшным тифом, лиц с подозрением на брюшной тиф, возможных, бактерионосителей *S. Typhi*, а также здоровых лиц с целью постановки и/или подтверждения диагноза и/или эпидемиологического мониторинга. Результаты, полученные при использовании МИ, должны применяться в сочетании с клиническими наблюдениями, информацией об истории болезни и эпидемической ситуации. Получение отрицательного результата не исключает инфицирования *S. Typhi* и не должно использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о необходимости лечения.

2. Характеристика МИ

2.1 Принцип метода

Принцип тестирования основывается на амплификации специфических фрагментов ДНК, экстрагированной из образцов исследуемого материала, в ходе петлевой изотермической амплификации (LAMP) в режиме реального времени. Контроль качества обеспечивается наличием в составе Набора реагентов специфичности детектирования: положительного контроля К⁺ и отрицательного контроля амплификации К⁻.

Основой для возникновения флуоресценции является амплификация фрагментов ДНК бактерии возбудителя брюшного тифа *S. Typhi*. Синтез ДНК происходит при помощи большого фрагмента (LF) *Bst* ДНК-полимеразы с высокой замещающей активностью в изотермических условиях при 63 °С. Для амплификации одного специфического участка ДНК используются 3 пары специфичных олигонуклеотидных праймеров, полностью или частично комплементарных к 8 участкам амплифицируемого фрагмента ДНК: внешние (F3, B3), внутренние (FIP, BIP) и дополнительные петлевые (LF, LB) диагностические праймеры. В ходе реакции образуются конкатемерные структуры, состоящие из повторов амплифицируемого фрагмента ДНК. Накопление продуктов амплификации детектируется по увеличению флуоресцентного сигнала от интеркалирующего красителя SYBR Green I по каналам SYBR или Green в зависимости от типа используемого амплификатора.

Учет результатов и установление наличия ДНК бактерии возбудителя брюшного тифа производится путем анализа данных о пороговом цикле амплификации (C_t) образца. Значение C_t выражается в количестве изотермических циклов (что соответствует времени накопления флуоресцентного сигнала), и определяет момент достижения флуоресценции образцов порогового уровня сигнала, задаваемого программным обеспечением или пользователем согласно стандартным методическим правилам. При этом наблюдается обратная зависимость значения порогового сигнала от концентрации целевой ДНК в пробе: наименьшее значение C_t соответствует максимальной концентрации ДНК бактерии *S. Typhi* в пробе. При малых концентрациях ДНК матрицы в пробе возможно отклонение вида накопления флуоресцентного сигнала от стандартной S-образной формы.

2.2 Состав набора реагентов

Набор реагентов выпускается в одном варианте комплектации, рассчитанном на 100 определений, включая положительный и отрицательный контрольные образцы (табл. 1).

Таблица 1 – Состав набора реагентов

Названия компонентов	Количество, объем (для жидкостей)
Реактив LAMP SYBR (2×)	1 шт., 1,25 мл
Реактив S. Typhi 3	1 шт., 1,15 мл
К+ ST	1 шт., 0,10 мл
К-	1 шт., 0,10 мл
Эксплуатационная документация	
Инструкция по применению	1 шт.
Копия паспорта качества	1 шт.

Каждое изделие сопровождается инструкцией по применению и копией паспорта качества. Инструкция по применению и копия паспорта качества должны быть изготовлены в бумажном виде. Также они могут быть дополнительно представлены на официальном сайте производителя в электронном виде (<https://pasteurorg.ru>).

1) Реактив LAMP SYBR (2×) представляет собой реакционную смесь, содержащую дезоксинуклеозидтрифосфаты, *Bst* ДНК-полимеразу, SYBR Green I и Mg^{2+} .

2) Реактив S. Typhi 3 содержит олигонуклеотидные праймеры.

3) К+ ST представляет собой раствор рекомбинантной плазмиды, содержащей целевую последовательность фрагмента генома бактерии *S. Typhi*.

4) К- представляет собой воду для лабораторного анализа.

В составе компонентов МИ отсутствуют материалы человеческого и животного происхождения.

МИ выпускается в одном варианте комплектации, рассчитанном на 100 определений.

2.2.1. Метрологическая прослеживаемость контрольных образцов (материалов) входящих в МИ

Метрологическая прослеживаемость измерений концентрации ДНК входящей в состав К+ оценена согласно иерархии калибровки в соответствии с ГОСТ ISO 17511-2011 при наличии выбранной производителем методики выполнения измерений, не являющейся международно признанной референтной методикой выполнения измерений, калибратора, не являющегося международно признанным, и без метрологической прослеживаемости до единиц СИ.

Материал	Калибровка, Приписывание значения	Методика	Внедрение	Неопределенность измерений $U_c(y)$, копий/мкл
		Выбранная производителем методика выполнения измерений: М-МГПМ-003 Методика определения количества ДНК методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR)	ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (производитель)	200
	Рабочий калибратор производителя: К1, К2, К3 (ДНК плазмиды, содержащей целевую последовательность фрагмента генома бактерии <i>S. Typhi</i>) в конц. 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 копий/мкл соответственно. (должны соответствовать ГОСТ Р ИСО 15194)			К1 – 200 К2 – 20 К3 – 2
		Установленная производителем методика выполнения измерений: Методика определения концентрации нуклеиновых кислот методом количественной ПЦР с использованием калибраторов	ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (производитель)	100
	Контрольные материалы правильности, изготовленные производителем: К+ ST			К+ ST – 200
		Рутинная методика выполнения измерений конечного потребителя: Согласно инструкции по применению медицинского изделия для диагностики <i>in vitro</i>	ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (производитель) Конечный потребитель	Неприменимо т.к. метод для качественного определения
Рутинная проба				

Рисунок 1. Метрологическая прослеживаемость контрольных материалов правильности.

Концентрации контрольных материалов (за исключением отрицательного контроля):

К+ ST представляет собой раствор рекомбинантной плазмиды, содержащей целевую последовательность фрагмента генома бактерии *S. Typhi*. Концентрация плазмиды 10^6 копий/мкл.

2.3 Функциональные показатели МИ

2.3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения определен путем построения стандартной кривой на основе данных о пороговых циклах флуоресценции в петлевой изотермической амплификации в ходе амплификации ДНК, выделенной из стандартного образца ДНК бактерии *S. Typhi*, в состав которого входит целевая нуклеотидная последовательность ДНК бактерии *S. Typhi*. Установленный предел обнаружения при использовании предписанной программы амплификации составляет 20000 копий/мл ДНК бактерии *S. Typhi*.

2.3.2 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

Исследование потенциальной интерференции проводили с такими веществами как: гемоглобин, билирубин, ДНК человека, ДНК бактериальная.

В процессе исследования были протестированы модельные образцы K+ ST входящие в состав МИ с добавлением веществ – потенциальных интерферентов. Контрольными являлись образцы K+ ST без добавлений других веществ. Для оценки возможного влияния потенциальных интерферентов сравнивали значения порогового цикла LAMP между испытуемыми и контрольными образцами и при разнице меньше, чем 1,5 цикла делали вывод об отсутствии практически значимого влияния вещества на результат LAMP. Выделение ДНК и процедуру LAMP проводили в соответствии с инструкциями по применению к МИ для выделения ДНК и к данному набору реагентов соответственно. Результаты исследования представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Результаты исследования с потенциальными интерферентами

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Эндогенные вещества	Гемоглобин	10 мг/мл	Не обнаружено
	Билирубин	210 мкмоль/л	Не обнаружено
	ДНК человека	1 мкг/мл	Не обнаружено
Экзогенные вещества	ДНК бактериальная	1 мкг/мл	Не обнаружено

2.3.3 Аналитическая специфичность

На этапе разработки производителем, была подтверждена аналитическая специфичность путем исследования с помощью МИ S. Typhi LAMP PS образцов, содержащих ДНК бактерий:

Salmonella enterica, штаммы: *Salmonella enterica* ser. Enteritidis EI425, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium EI426, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium EI427, *Salmonella enterica* ser. Newport EI429, *Salmonella enterica* ser. Enteritidis EI431, *Salmonella enterica* ser. Senftenberg EI452, *Salmonella enterica* ser. Kentucky EI453, *Salmonella enterica* ser. Muenchen EI454, *Salmonella enterica* ser. Kottbus EI455, *Salmonella enterica* ser. Virchow EI424;

Escherichia coli (штаммы 19-119, 14-640, 20-228), *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia vulneris*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

2.3.4 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определена, как процент истинно положительных результатов от суммы истинно положительных и ложноотрицательных результатов, при проведении исследования клинических образцов, в том числе, содержащих целевую последовательность ДНК бактерии *S. Typhi*. Диагностическая чувствительность составляет по данным клинико-лабораторных испытаний 100 % для всех клинических образцов. Однако истинная диагностическая чувствительность с доверительным интервалом 90 % составляет 95 % при $n = 50$ для образцов фекалий, истинная диагностическая чувствительность, с доверительным интервалом 90 % составляет 95 % при $n = 50$ для образцов крови и истинная диагностическая чувствительность, с доверительным интервалом 90 % составляет 95 % при $n = 50$ для образцов мочи.

2.3.5 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определена как процент истинно отрицательных результатов от суммы истинно отрицательных и ложноположительных результатов при проведении исследования клинических образцов, в том числе содержащих целевую последовательность ДНК бактерии *S. Typhi*. Диагностическая специфичность составляет по данным клинико-лабораторных исследований 100 % для всех клинических образцов. Однако истинная диагностическая специфичность, при доверительном интервале 90 % составляет 95 % при $n = 50$ для образцов фекалий, 95 % при $n = 50$ для образцов крови и 95 % при $n = 50$ для образцов мочи.

2.3.6 Воспроизводимость

В результате исследования воспроизводимости установлено, что коэффициент вариации значений положительного образца по каналу SYBR/Green составил 0,115 (серия 001), 0,148 (серия 002), 0,400 – между двумя аналитическими сериями.

3. Меры предосторожности

3.1 Общие требования

Бактерия *S. Typhi* относится к патогенным биологическим агентам (ПБА).

Лаборатория, выполняющая работы с материалом, потенциально инфицированным *S. Typhi*, должна иметь санитарно-эпидемиологическое заключение о соответствии санитарным правилам условий проведения работ с ПБА соответствующей группы патогенности.

К работе с материалом, потенциально инфицированным *S. Typhi*, следует допускать только обученных сотрудников, имеющих разрешение на работу с ПБА

соответствующей группы патогенности и прошедших обучение на курсах профессиональной подготовки с освоением методов безопасной работы с ПБА.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

– процесс работы с образцами, оборудованием и реагентами должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в зоне подготовки (№1), продолжать в зоне выделения НК (№2) и проведения петлевой изотермической амплификации (№3). Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса;

– утилизировать образцы в соответствии с действующими государственными санитарными правилами и нормами, также и нормативными правовыми документами в сфере обращения с отходами;

– использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов;

– поверхности столов, а также помещения, в которых проводится петлевая изотермическая амплификация, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин;

– набор реагентов предназначен для дробного однократного применения для проведения петлевой изотермической амплификации с указанным количеством проб (см. раздел «Состав»);

– применять набор строго по назначению в соответствии с инструкцией по применению;

– все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования действующих государственных санитарных правил и норм;

– не использовать набор реагентов, если при первом использовании заводская упаковка вскрыта или повреждена, внешний вид реагента не соответствует описанию;

– не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции;

– не использовать набор реагентов по истечении срока годности;

– использовать медицинские одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, ламинарные боксы во время работы с образцами и реагентами, тщательно вымыть

руки по окончании работы. Все операции проводить только в перчатках для исключения контакта с организмом человека (пользователя);

– избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью;

– информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу к производителю.

3.2 Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности МИ безопасно.

4. Требуемое дополнительное оборудование и материалы

4.1 Набор реагентов не содержит реагентов для выделения ДНК. Для выделения ДНК следует использовать один из наборов:

– «Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала "МАГНО-сорб" по ТУ 9398-106-01897593-2012», форма 4 и форма 5 – с материалами образцов кровь, моча, фекалии.

– «Набор реагентов для экстракции ДНК из биологического материала человека "НК-Магно" по ТУ 21.20.23-004-35531509-2017» – для выделения НК из фекалий и мочи.

Также при выделении НК следует использовать оборудование и материалы, предписанные инструкцией по применению к выбранному набору для выделения НК.

4.3 Другое требуемое оборудование и материалы

– программируемый амплификатор (термоциклер) с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени с обязательным наличием канала детекции флуоресценции FAM/SybrGreen/Green роторного или планшетного типа. Валидированы для совместного применения с МИ: термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот C1000 Touch с оптическим модулем CFX96 или CFX384 ((Bio-Rad Laboratories Inc. («Био-Рад Лабораториз Инк»), США, РУ № ФСЗ 2008/03399) планшетного типа или роторного типа - Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), РУ № ФСЗ 2010/07595.

– бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) («БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия или аналогичный по техническим характеристикам);

– морозильная камера, поддерживающая температуру от минус 28 °С до минус 14 °С;

– мини-центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» со скоростью вращения до 13000 об/мин (мини-центрифуга Microspin 12, BioSan, Латвия или аналогичная по техническим характеристикам);

– центрифуга-вортекс со скоростью вращения 1500–3000 об/мин (мини-центрифуга-вортекс FV-2400, BioSan, Латвия, или аналогичная по техническим характеристикам);

– программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени с обязательным наличием каналов детекции флуоресценции FAM/SYBR/Green планшетного типа – C1000 Touch с оптическим модулем CFX96 или CFX384 (Bio-Rad Laboratories Inc. («Био-Рад Лабораториз Инк»), США) или роторного типа - Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), или аналогичные по техническим характеристикам;

– дозаторы пипеточные одноканальные переменного объема от 0,5 до 10 мкл; от 10 до 100 мкл; от 100 до 1000 мкл («Биохит», Россия; РУ № РЗН 2019/9356);

– штативы для пробирок объемом 0,2 мл, 1,5 мл, 2,0 мл;

– одноразовые наконечники к дозаторам медицинским лабораторным с аэрозольным барьером, сертифицированные на отсутствие ДНКаз и РНКаз;

– емкость для сброса отходов;

– тонкостенные оптически прозрачные пробирки для ПЦР сертифицированные на отсутствие ДНКаз и РНКаз объемом 0,2 мл с плоской крышкой – при использовании прибора планшетного типа;

– тонкостенные оптически прозрачные пробирки для ПЦР сертифицированные на отсутствие ДНКаз и РНКаз объемом 0,2 мл с плоской или выпуклой крышкой – при использовании прибора роторного типа;

– отдельный халат, шапочки, обувь и перчатки медицинские одноразовые неопудренные;

Допускается применение других материалов и оборудования, эквивалентных по техническим характеристикам и квалификации.

5. Анализируемые пробы

Образцами для анализа являются препараты нуклеиновых кислот, выделенных из биоматериала человека: фекалий, плазмы крови и мочи.

Все действия по подготовке проб, должны проводиться в соответствии с положениями, перечисленными в разделе «Меры предосторожности».

5.1 Сбор, подготовка и хранение образцов

Сбор, подготовка, транспортирование, хранение, образцов исследуемого материала осуществляется специально обученным медицинским персоналом в соответствии с действующими нормативно-правовыми документами: санитарными правилами и нормами, методическими указаниями, рекомендациями для соответствующих видов образцов.

5.2 Выделение нуклеиновых кислот

Выделение нуклеиновых кислот проводят в соответствии с инструкциями по применению для наборов реагентов для выделения НК, рекомендованными для совместного применения с данным медицинским изделием (см. раздел 4 Требуемое дополнительное оборудование и материалы).

6. Проведение исследования

6.1 Условия проведения процедуры исследования

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Все работы проводят при температуре от 20 °С до 28 °С, относительной влажности от 15 до 75%. Набор не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности.

Необходимо использовать медицинские одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, ламинарные боксы во время работы с образцами и реагентами, тщательно вымыть руки по окончании работы.

Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

Необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

Не допускается повторное использование наконечника.

Все использованные одноразовые материалы подвергают обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

6.2 Меры предотвращения контаминации

Исследования следует проводить с учетом методических материалов по организации работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим патогенные микроорганизмы.

Разные этапы работы необходимо проводить в отдельных помещениях в условиях изолированных зон, снабженных необходимыми расходными материалами и оборудованием. В работе с набором реагентов задействованы следующие зоны:

- зона № 1 для приема, регистрации и первичной обработки биологического материала (подготовка исследуемых образцов);
- зона № 2 для выделения нуклеиновых кислот;
- зона № 3 для проведения петлевой изотермической амплификации и учета результатов.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится пробоподготовка и петлевая изотермическая амплификация, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ не менее 30 мин.

6.3 Требования к персоналу

Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться специалистами, обученными методам молекулярной диагностики, правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории. К работе с материалом, потенциально инфицированным *S. Typhi*, следует допускать только профессиональных сотрудников, имеющих разрешение на работу с ПБА, соответствующей бактерии *S. Typhi* группы и прошедших обучение на курсах профессиональной подготовки с освоением методов безопасной работы с ПБА.

6.4 Экстракция ДНК из исследуемого материала

Использование набора подразумевает работу с готовыми образцами ДНК, выделенными из клинического материала. В состав набора не входят реагенты для выделения ДНК. Для выделения ДНК из клинических образцов рекомендуется использовать наборы реагентов, предназначенные для выделения ДНК (см. раздел Требуемое дополнительное оборудование и материалы).

В зоне № 2 проводят экстракцию ДНК согласно инструкции производителя набора для выделения ДНК. Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в объеме 10 мкл.

Полученные образцы ДНК могут храниться в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

6.5 Подготовка образцов к постановке петлевой изотермической амплификации (LAMP)

В зоне № 3 извлекают из морозильной камеры (от минус 28 °С до минус 14 °С) и размещают в боксе абактериальной воздушной среды все компоненты Набора Реагентов.

Выдерживают при комнатной температуре (от 20 °С до 28 °С) в течение 10 минут до полного размораживания и уравнивания температуры.

Пробирки с контрольными образцами (К+ ST, К-) встряхивают на вортексе, осаждают капли коротким центрифугированием 5 с при 2400 об/мин.

Рассчитывают необходимый объем компонентов для общей реакционной смеси, исходя из количества исследуемых образцов, учитывая необходимость постановки положительных и отрицательных контролей реакции K+ ST, K- (таблица 3).

Таблица 3 – Реакционная смесь для петлевой изотермической амплификации

Компонент	Объем на одну реакцию, мкл
Реактив LAMP SYBR (2×)	12,5
Реактив S. Typhi 3	11,5

Приготовить общую реакционную смесь.

Тщательно перемешать общую реакционную смесь встряхиванием на вортексе, осадить капли со стенок пробирок в микроцентрифуге в течение 5 с.

Перенести пробирку с общей реакционной смесью в зону № 3.

Подготовить пробирки 0,2 мкл установить в штатив. На пробирки не наносят надписи, чтобы исключить влияние на флуоресценцию.

Внести по 24 мкл общей реакционной смеси во все пробирки для LAMP в соответствии с числом исследуемых проб.

В зоне № 3 подготовить контрольные и исследуемые образцы ДНК. После размораживания контрольные и исследуемые образцы центрифугировать в микроцентрифуге в течение 5 с для осаждения капель со стенок и крышки.

Добавить 1 мкл K- в пробирки для отрицательного контроля.

Добавить 1 мкл K+ ST в пробирки для положительного контроля LAMP.

Закрывать крышки пробирок для амплификации, тщательно перемешивают каждую пробирку встряхиванием на вортексе в течение 10 с, осаждают капли центрифугированием в мини-центрифуге в течение 5 с при 2400 об/мин.

6.6 Работа с программным обеспечением амплификатора

Установить пробирки для LAMP в блок амплификатора.

Запустить программное обеспечение (ПО) амплификатора. Открыть созданный ранее шаблон в ПО. Ввести через интерфейс ПО необходимые параметры, которые зависят от типа амплификатора (см. таблицы 4 и 5), также ввести программу амплификации ДНК по таблице 7. Далее создать разметку в соответствии с установленными пробирками блока амплификатора, выбрать канал детекции FAM/SYBR/Green, запустить программу амплификации.

Таблица 4 – Основные параметры для программного обеспечения амплификатора роторного типа – Rotor Gene Q

Канал	Threshold	Dynamic tube	Slope Correct	More Settings/Outlier Removal/NTC Threshold	More Settings/Outlier Removal/Reaction Efficiency Threshold
Green	Устанавливается на уровне 10% от максимума флуоресцентного сигнала, соответствующая экспоненциальному нарастанию флуоресцентного сигнала образца K+ ST в последнем цикле	+	+	0-10% *	0-10% *

Примечание. * - на усмотрение пользователя. Устанавливается в зависимости от уровня фонового сигнала. При высоком уровне фонового сигнала рекомендуется 10%, при низком – 0%.

Таблица 5 – Основные параметры для программного обеспечения амплификатора планшетного типа – C1000 Touch

Канал	Baseline settings		Baseline threshold
	Baseline subtracted	Apply fluorescence drift correction	
FAM/Green	+	-	Устанавливается <i>либо</i> автоматически через Baseline cycles и Single Threshold -> Auto-calculated и должно отвечать уровню 10% от максимума флуоресцентного сигнала, соответствующая экспоненциальному нарастанию флуоресцентного сигнала образцов K+ ST в последнем цикле, <i>либо</i> может быть выставлен вручную на уровне 10% от максимума флуоресцентного сигнала,

			соответствуя экспоненциальному нарастанию флуоресцентного сигнала образцов K+ ST в последнем цикле
--	--	--	--

Таблица 6 – Программа петлевой изотермической амплификации

Температура, °С	Время	Кол-во циклов
63	60 секунд *	35

* шаг с чтением планшета для анализа LAMP в реальном времени

6.7 Регистрация результатов

Детекция продуктов амплификации проводится в режиме реального времени по каналу SYBR/Green с использованием детектирующего термоциклера согласно инструкции к прибору.

6.8 Анализ и интерпретация результатов петлевой изотермической амплификации

Первичную обработку данных проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения LAMP с детекцией в режиме реального времени.

При первичной обработке анализируют графики накопления ДНК по сигналу флуоресценции относительно циклов LAMP. Определяют значение флуоресценции, которое превышает порог фона и соответствует началу участка экспоненциального накопления продукта LAMP с каждым новым циклом. Далее определяют, все ли кривые сигнала флуоресценции относительно цикла LAMP имеют следующие свойства:

- значения сигнала флуоресценции имеют нарастающую тенденцию, график сигнала флуоресценции имеет S-образную форму (для малых концентраций ДНК форма графика может отличаться);

- кривая сигнала флуоресценции по каналу SYBR/Green пересекает пороговую линию на участке роста;

- если на амплификаторе планшетного типа C1000 Touch после обработки результатов кривая нарастания флуоресценции начинается ниже 0, необходимо отключить функцию “Apply Fluorescence Drift Correction” / ”Применить поправку на смещение флуоресценции”.

Для кривых, удовлетворяющих этим критериям, определяют пороговый цикл C_t – цикл амплификации, при котором флуоресценция по данному каналу для данного образца достигла порогового значения флуоресценции. Значение порогового цикла C_t совпадает

со значением времени амплификации в минутах согласно заданной программе амплификации.

6.9 Интерпретация результатов петлевой изотермической амплификации

При интерпретации результатов отслеживают один параметр: значение порогового цикла Ct по каналу SYBR/Green, как свидетельство выполнения петлевой изотермической амплификации в пробе с K+ ST.

Результат испытания считают не соответствующим критериям приемлемости, если:

- во время прохождения реакции не регистрируется рост уровня флуоресценции по каналу SYBR/Green в пробирке с K+ ST, или полученные значения порогового цикла Ct не соответствуют диапазону, указанному для K+ в таблице 1; в данной ситуации необходимо повторное испытание всех образцов, начиная с момента постановки петлевой изотермической амплификации;

- в пробирке с K- регистрируется рост уровня флуоресценции по каналу SYBR/Green; в данной ситуации необходимо принятие мер для устранения контаминации в лаборатории и повторное исследование всех образцов начиная с этапа амплификации;

Результаты испытания считают соответствующим критериям приемлемости, если:

- во время прохождения амплификации регистрируется рост уровня флуоресценции по каналу SYBR/Green в пробирках с K+ ST и полученные значения порогового цикла Ct соответствуют диапазону, указанному в таблице 7;

- если во время прохождения амплификации отсутствует флуоресцентный сигнал по всем каналам в пробирке с K- (таблица 7).

Таблица 7 – Значение порогового цикла LAMP (Ct) контрольных образцов

Образец	Канал детекции SYBR/Green	
	Прибор роторного типа	Прибор планшетного типа
K+ ST	≤ 14	≤ 15
K-	Не определяется	Не определяется

Таблица 8 – Интерпретация результатов петлевой изотермической амплификации

Анализируемый параметр	Пороговый цикл LAMP (Ct)
	Канал FAM/Green
Образец положителен на наличие ДНК бактерии <i>S. Typhi</i>	≤ 30
Образец отрицателен на наличие ДНК бактерии <i>S. Typhi</i>	Не определяется
Результат сомнительный	>30

При соблюдении требований перечисленных пунктов заключение о наличии либо отсутствии в анализируемом клиническом образце ДНК *S. Typhi* делается в соответствии с таблицей 8.

6.10 Действия при сомнительном результате

При значениях Ct, интерпретируемым согласно указаниям в таблице 8, как «результат сомнительный», следует провести повторный анализ с образцом, начиная с этапа выделения ДНК. При невозможности повторного выделения ДНК следует провести повторный анализ, начиная с этапа петлевой изотермической амплификации. При повторном сомнительном или отрицательном результате его следует интерпретировать как отрицательный. При положительном результате повторного анализа его следует интерпретировать как положительный.

ВНИМАНИЕ!

Отрицательные результаты не исключают возможность наличия ДНК бактерии *S. Typhi* в образце и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия медицинских решений. Результаты должны сочетаться с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

Набор реагентов *S. Typhi* LAMP PS не определяет наличие ДНК бактерии *S. Typhi*, если концентрация целевой ДНК в образце ниже 20 000 копий/мл.

7. Условия транспортирования и хранения МИ

7.1 Транспортирование

Транспортировать Набор реагентов следует всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта при температуре от минус 10 °С до минус 15 °С в течение не более 3 суток. От минус 15 °С до минус 22 °С в пределах срока годности.

Набор реагентов, транспортировавшийся с нарушением температурного режима, использовать запрещается, он подлежит утилизации согласно указаниям раздела 9 как пришедший в негодность.

7.2 Хранение

Компоненты набора реагентов до вскрытия и после вскрытия должны храниться согласно рекомендациям в течение всего срока годности в соответствии со следующими температурными режимами: компоненты Реактив LAMP SYBR (2×), Реактив *S. Typhi* 3, К+ ST и К- должны храниться при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С.

ВНИМАНИЕ!

Для компонентов Реактив LAMP SYBR (2×) допускается не более 2 циклов замораживания-размораживания, для компонентов Реактива S. Typhi 3 и K+ ST не более 4 таких циклов.

Допускается аликвотирование реактивов, при соблюдении указанных условий хранения, в пробирки сертифицированные на отсутствие ДНКаз и РНКаз.

Следует беречь набор реагентов от воздействия солнечного света и влаги.

Холодильники и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

МИ, хранившиеся с нарушением температурного режима, использовать запрещается, их необходимо утилизировать как пришедшие в негодность в соответствии с указаниями раздела 8.

8. Указания по безопасной утилизации

Отходы, образующиеся в результате применения набора реагентов по назначению, установленному производителем, а также не использованные изделия (с истекшим сроком годности, поврежденной упаковкой) относятся к медицинским отходам.

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

9. Гарантии производителя

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов в течение установленного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.


Гарантийный срок годности набора – 12 месяцев от даты изготовления.


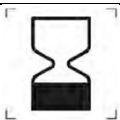


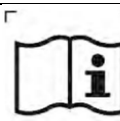

10. Ремонт и техническое обслуживание

Набор реагентов предназначен для дробного однократного использования. Не подлежит ремонту и техническому обслуживанию.

11. Объяснение используемых символов

Таблица 11 – Объяснение символов, которые могут использоваться в маркировке

Символ	Название символа	Значение символа
	Изготовитель	Рядом с символом указаны наименование и адрес изготовителя

Символ	Название символа	Значение символа
		медицинского изделия
	Дата изготовления	Рядом с символом указана дата изготовления медицинского изделия
	Использовать до, срок годности	Рядом с символом указана дата, после которой медицинское изделие не должно применяться
	Код партии	Рядом с символом указан код партии медицинского изделия, установленный производителем
	Предел температуры	Рядом с верхними и нижними горизонтальными линиями указаны границы температурного диапазона, в пределах которого медицинское изделие может надежно сохраняться
	Обратитесь к инструкции по применению	Указывает на необходимость для пользователя ознакомиться с инструкцией по применению
	Медицинское изделие для диагностики in vitro	Указывает, что медицинское изделие является изделием для диагностики in vitro

Символ	Название символа	Значение символа
	<p>Содержимого достаточно для проведения n тестов</p>	<p>Рядом с символом указано количество тестов, которые могут быть выполнены с использованием медицинского изделия</p>
	<p>Специальный знак обращения медицинских изделий на рынке Евразийского экономического союза</p>	<p>Знак обращения свидетельствует о том, что медицинское изделие, маркированное им, прошло установленную в рамках Союза процедуру регистрации и подтверждения соответствия общим требованиям безопасности и эффективности медицинских изделий и требованиям к внедрению и поддержанию системы менеджмента качества медицинских изделий</p>
	<p>Не допускать воздействия солнечного света</p>	<p>Указывает, что медицинское изделие необходимо защищать от воздействия солнечного света и держать вдали от источников тепла</p>
	<p>Беречь от влаги</p>	<p>Указывает, что медицинское изделие необходимо защищать от воздействия влаги</p>

12. Контактная информация для обращений

По вопросам касающимся качества Набора реагентов для выявления *ДНК Salmonella enterica* серовар Typhi методом петлевой изотермической амплификации в реальном времени (S. Typhi LAMP PS), следует обращаться к предприятию-изготовителю ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера по адресу: 197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, телефон: +7 (812) 233-20-92, +7 (812) 644-63-17, факс: +7 (812) 644-63-10, электронный адрес: pasteur@pasteurorg.ru, официальный веб-сайт <https://pasteurorg.ru>.

13. Информация о пересмотре настоящей Инструкции.

Настоящая инструкция составлена впервые. Дата утверждения указана на титульном листе настоящей инструкции. Пересмотр инструкции проводится на производстве ежегодно при отсутствии изменений, а также дополнительно по мере необходимости внесения изменений (согласно ГОСТ ISO 13485-2017). В случае внесения изменений в эксплуатационную документацию инициируется соответствующая процедура информирования об этом уполномоченного государственного органа и после этого об изменениях информируются пользователи. В случае отсутствия изменений действие данной версии документа продлевается автоматически без уведомлений об этом пользователей и уполномоченных органов.