

## **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

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

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 (Ct) образца. Значение Ct 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 Ct 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
<b>Эксплуатационная документация</b>	
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
		<b>Выбранная производителем методика выполнения измерений:</b> М-МГПМ-003 Методика определения количества ДНК методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR)	ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (производитель)	200
	<b>Рабочий калибратор производителя:</b> К1, К2, К3 (ДНК плазмиды, содержащей целевую последовательность фрагмента генома бактерии <i>S. Typhi</i> ) в конц. $1 \times 10^5$ , $1 \times 10^6$ , $1 \times 10^7$ копий/мкл соответственно. (должны соответствовать ГОСТ Р ИСО 15194)			К1 – 200 К2 – 20 К3 – 2
		<b>Установленная производителем методика выполнения измерений:</b> Методика определения концентрации нуклеиновых кислот методом количественной ПЦР с использованием калибраторов	ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (производитель)	100
	<b>Контрольные материалы правильности, изготовленные производителем:</b> К+ ST			К+ ST – 200
		<b>Рутинная методика выполнения измерений конечного потребителя:</b> 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
<b>Рутинная проба</b>				

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

<b>Вид потенциального интерферента</b>	<b>Потенциальный интерферент</b>	<b>Протестированная концентрация в образце</b>	<b>Наличие интерференции</b>
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.

Закрыть 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
<b>Green</b>	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	
<b>FAM/Green</b>	+	-	Устанавливается <i>либо</i> автоматически через <b>Baseline cycles</b> и <b>Single Threshold</b> -> <b>Auto-calculated</b> 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.


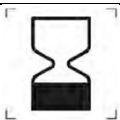


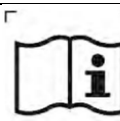

### **10. Ремонт и техническое обслуживание**

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

<b>Символ</b>	<b>Название символа</b>	<b>Значение символа</b>
	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](mailto: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.