ОГЛАВЛЕНИЕ

1	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ МАРКИРОВКИ КОМПОНЕНТОВ ТЕСТ-СИСТЕМЫ	3
2	НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ	4
3	ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ	4
3.1	Принцип метода	4
3.2	Состав тест-системы	4
4	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
5	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	
6	ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	5
7	ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	5
7.1	Проведение ПЦР	6
7.2	Анализ и интерпретация результатов	6
8	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ	7
9	УКАЗАНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ	7
10	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	7

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ МАРКИРОВКИ КОМПОНЕНТОВ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Символ	Наименование символа
	Изделие медицинское для диагностики *in vitro*
	Изготовитель
	Обратитесь к инструкции по применению
	Ограничение температуры
	Срок годности
	Дата изготовления
	Номер серии
	Максимальное число тестов
	Не допускать попадания солнечного света

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2 НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система предназначена для выявления шигатоксин-продуцирующей *E. coli* (гены *stx1, stx2, eae*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «STEC – шигатоксин 1 и 2 типа».

Выявление ДНК STEC используется для клинической лабораторной диагностики заболеваний, вызванных STEC у пациентов с диареей, геморрагическим колитом и гемолитико-уремическим синдромом с дифференциацией шигатоксинов 1 и 2 типа (гены *stx1, stx2*) и выявлением фактора адгезии интимина (ген *eae*).

3 ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ

3.1 Принцип метода

Выявление специфической ДНК STEC осуществляется в 3 этапа:

1. Выделение ДНК из исследуемого клинического материала (реагенты для выделения ДНК не входят в состав тест-системы). Для выделения ДНК рекомендуется использовать набор, предназначенный для экстракции ДНК из биологического материала человека, включая фекалии, в соответствии с прилагаемой к ним инструкцией.

2. Приготовление реакционной смеси и проведение ПЦР в режиме реального времени. Детекция мишеней *stx1* и *eae* осуществляется по каналам FAM, ROX, детекция мишени *stx2* осуществляется по каналу HEX, детекция внутреннего контроля (ВК) осуществляется по каналу ROX.

3. Учет и анализ данных.

В ходе ПЦР в режиме реального времени происходит накопление специфических продуктов реакции, регистрируемых путём измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Анализ результатов осуществляется путем определения значения порогового цикла реакции Ct как точки пересечения кривой флуоресценции и пороговой линии.

В состав реакционной смеси включены набор олигонуклеотидных праймеров и зондов для выявления ДНК генов *stx1* и *stx2*, кодирующих шигатоксин 1 и 2 типа, и гена *eae*, кодирующего интимин, который обуславливает адгезию к поверхности эпителия кишечника. Образец, положительный на один или оба гена, кодирующих шигатоксин (stx1/stx2) и положительный или отрицательный на ген *eae*, считается положительным на STEC. В качестве ВК использован ген человека, который присутствует во всех клинических образцах от пациентов.

3.2 Состав тест-системы

Тест-система «STEC – шигатоксин 1 и 2 типа» рассчитана на проведение 25 реакций, включая контроли. Состав тест-системы представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Состав тест-системы «STEC – шигатоксин 1 и 2 типа»

№	Название реактива	Описание	Объем, мл	Количество
1	ПЦР смесь 1 «eae/stx1»	Прозрачная светло-розовая жидкость	0,33	1 пробирка
2	ПЦР смесь 2 «stx2/ВК»	Прозрачная светло-розовая жидкость	0,33	1 пробирка
3	Taq ДНК-полимераза	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	0,03	1 пробирка
4	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,11	1 пробирка
5	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,11	1 пробирка
6	Вода для ПЦР	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность тест-системы.

Тест-система позволяет обнаружить генетический материал STEC, что подтверждалось секвенированием детектируемых участков генов.

Показано отсутствие неспецифических реакций в отношении других возбудителей кишечных инфекций (*Adenovirus, Norovirus, Rotavirus, Blastocystis, Cryptosporidium, Gardia, Clostridium difficile, Bacteroides fragilis, Campylobacter, Helicobacter pylori, Aeromonas, Salmonella*), а также в отношении образцов ДНК человека.

Аналитическая специфичность составила 100%.

Аналитическая чувствительность тест-системы составляет 10^3ГЭ/мл.

5 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней с соблюдением Санитарных норм и правил «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 января 2017 г. № 2.

Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы необходимо, используя дезинфицирующие средства в соответствии с Санитарными нормами и правилами «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 7 февраля 2018 г. №14.

Работа проводится только в одноразовых перчатках, используются одноразовые наконечники с фильтром для автоматических пипеток и одноразовые пробирки.

При утилизации пробирок, содержащих продукты ПЦР после амплификации, недопустимо их открытие и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами амплификации лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

6 ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, например, CFX96, IQ 5 (Bio-Rad, США); Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), 7500 (Applied Biosystems, США) или другой аналогичный любой марки.
2. Бокс для ПЦР с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф.
3. Мини центрифуга-вортекс
4. Набор одноканальных пипеток переменного объема 2-20, 20-200 и 100-1000 мкл.
5. Одноразовые наконечники с фильтром для пипеток объемом до 20, до 200 и до 1000 мкл в штативах.
6. Пробирки свободные от РНКаз и ДНКаз типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.
7. Пробирки свободные от РНКаз и ДНКаз, оптически-прозрачные объемом 0,2 мл.
8. Штативы для микропробирок на 0,2 мл и 1,5 мл.
9. Криоштатив или контейнер со льдом.
10. Холодильная установка, поддерживающая температуру +4…+8 °С, с морозильной камерой с температурой минус 18 минус 20 °С;
11. Отдельные халаты, шапочки, обувь и одноразовые резиновые перчатки без талька
12. Ёмкость для сброса наконечников.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7 ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

7.1 Проведение ПЦР

7.1.1 Исследование каждого образца проводится параллельно в двух отдельных пробирках: с ПЦР смесью 1 «eae/stx1» и ПЦР смесью 2 «stx2/ВК». В соответствии с этим составить протокол анализа с учётом двух контрольных образцов и количества исследуемых образцов.

7.1.2 Разморозить все компоненты тест-системы. Перемешать содержимое пробирок на центрифуге-вортексе и осадить капли с крышек пробирок. Поместить пробирки в криоштатив или контейнер со льдом.

7.1.3 Отобрать и промаркировать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл для амплификации исследуемых образцов с учетом ОКО и ПКО (**N**).

7.1.4 Приготовить реакционную смесь 1 из расчета на **N** образцов. Для этого в отдельной стерильной пробирке объемом 1,5 мл смешать **12,0xN мкл ПЦР смеси 1 «eae/stx1», 4,5xN мкл воды для ПЦР** и **0,5xN мкл Taq ДНК-полимеразы.** Общий объем смеси составит **17,0xN** мкл.

7.1.5 Аналогичным образом приготовить реакционную смесь 2 из расчета на **N** образцов. Для этого в отдельной стерильной пробирке объемом 1,5 мл смешать **12,0xN мкл ПЦР смеси 2 «stx2/ВК», 4,5xN мкл воды для ПЦР** и **0,5xN мкл Taq ДНК-полимеразы.** Общий объем смеси составит **17,0xN** мкл.

7.1.6 Перемешать реакционные смеси на центрифуге-вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

7.1.6 Поместить промаркированные пробирки объемом 0,2 мл в криоштатив или в контейнер со льдом, внести в них **по 15 мкл** приготовленных реакционных смесей 1 и 2.

7.1.7 Добавить **по 10 мкл анализируемого образца** в пробирки с реакционной смесью 1 и реакционной смесью 2. Осадить капли на вортексе.

7.1.8 Для проведения отрицательной контрольной реакции добавить **по 10 мкл ОКО** в пробирки с реакционной смесью 1 и 2, для положительной контрольной реакции - **по 10 мкл ПКО.** Осадить капли на вортексе

7.1.9 Запрограммировать прибор для выполнения соответствующего режима амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (таблица 2). Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам FAM, HEX и ROX.

Таблица 2 - Режим амплификации.

Этап	Температура, °С	Время, секунда	Кол-во циклов, шт
Начальная денатурация	95	120	1
Денатурация	95	10	45
Отжиг праймеров / элонгация / детекция флуоресцентного сигнала*	60	45	

Примечание: * - детекция флуоресцентного сигнала осуществляется по каналам для флуорофоров FAM, HEX и ROX

7.1.10 Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора и запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

7.2 Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Результаты амплификации анализируют по трем каналам (FAM, HEX и ROX) на основании наличия/ отсутствия пересечения кривой флуоресценции на каждом из каналов с установленной на

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла Ct.

7.2.1 В первую очередь проводят учет результатов для контрольных образцов (ОКО и ПКО). Результат ПЦР считается достоверным, если в ходе исследования получены результаты в соответствии с параметрами оценки, представленными в таблице 3.

Таблица 3 – Значение пороговых циклов Ct контролей амплификации

Контроль	ПЦР смесь 1 «eae/stx1»		ПЦР смесь 2 «stx2/ВК»	
	eae / ROX	**stx1 / FAM**	**stx2 / HEX**	**ВК / ROX**
ОКО	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
ПКО	≥ 27 и ≤ 33	≥ 27 и ≤ 33	≥ 27 и ≤ 33	≥ 27 и ≤ 33

7.2.2 При анализе на приборе BioRad для всех каналов уровень пороговой линии необходимо установить на 10% от максимального уровня флуоресценции образца ПКО в последнем цикле амплификации.

7.2.3 Для исследуемых проб результат ПЦР считать **положительным**, если кривая флуоресценции имеет типичную для ПЦР в режиме реального времени S-образную форму, однократно пересекается с пороговой линией и значение порогового цикла Ct для канала **ниже или равно 40**. Результат считать **отрицательным** в случае отсутствия кривой типичной формы или отсутствия пересечения с пороговой линией (нет значения Ct) или значение порогового цикла Ct **выше 40**.

7.2.4 При учете результатов для ВК (ROX) положительный результат должен быть получен для всех исследуемых образцов. Если для какого-то образца получен отрицательный результат ВК, необходимо повторить анализ такого образца.

7.2.5 Образец считается **STEC положительным**, если получен положительный результат по одному или обоим генам, кодирующим шигатоксин (**stx1/stx2**) при положительном или отрицательном результате по гену *eae*.

8 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

8.1 Транспортирование тест-системы должно производиться при температуре +2…+8°С в течении 24 часов в закрытых транспортных контейнерах при полном исключении попадания прямых солнечных лучей на прозрачные части упаковки.

8.2 Тест-систему хранят от минус 18 до минус 20°С. При хранении в таких условиях тест-система пригодна к использованию после вскрытия в течение всего срока годности.

8.3 Срок годности тест-системы – 12 месяцев со дня приемки ОБК изготовителя.

Тест-система с истекшим сроком годности применению не подлежит.

9 УКАЗАНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

Тест-система должна использоваться согласно Инструкции по применению, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

10 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие тест-системы заявленным параметрам при соблюдении потребителем условий транспортирования и хранения, установленных ТУ BY 100468797.003 – 2025.

При нарушении условий транспортировки специфическая активность компонентов тест-системы может снизиться. Рекламации на качество направлять на предприятие-изготовитель по адресу: 220114, Минск, ул. Филимонова, 23, Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», тел. (017) 322-89-33.

Изготовитель сохраняет за собой право изменять или модифицировать продукт в целях улучшения его применения и дизайна.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru