

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)

В.Г. Акимкин
« 02 » 08 2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для диагностики in vitro

АмплиСенс® ДНК-чип ООИ-1

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

Разработано совместно с ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора
(142279, Московская область, п. Оболенск, тел.: +7 (4967) 36-00-03, e-mail: info@obolensk.org)

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	10
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	14
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК/РНК.....	16
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	18
ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	18
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	18
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ	19
СОСТАВ	20
ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ.....	21
ТРАНСКРИПЦИЯ	23
ГИБРИДИЗАЦИЯ.....	24
А. Приготовление растворов	25
Б. Проведение гибридизации	26
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	28
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	34
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	34
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	36

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	- рибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
K+	- положительный контроль ПЦР
K-	- отрицательный контроль ПЦР
НТФ	- нуклеозид-5'-трифосфат
ООИ	- особо опасные инфекции
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ	- обратная транскрипция
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
РУ	- регистрационное удостоверение
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Ba, <i>B.anthraxis</i>	- возбудитель сибирской язвы <i>Bacillus anthracis</i>
Bru	- возбудитель бруцеллеза
EBOV	- вирус Эбола
Ft, <i>F.tularensis</i>	- возбудитель туляремии <i>Francisella tularensis</i>
IVA	- вирус гриппа А
Cy5	- флуорофор cyanine 5
PBS	- фосфатно-солевой буфер
Lp, <i>L.pneumophila</i>	- возбудитель легионеллеза <i>Legionella pneumophila</i>
Yp, <i>Y.pestis</i>	- возбудитель чумы <i>Yersinia pestis</i>

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® ДНК-чип ООИ-1, далее – набор реагентов, предназначен для одновременного качественного определения фрагментов нуклеиновых кислот возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний, вызывающих лихорадочные состояния, а именно ДНК возбудителя сибирской язвы (*B.anthraxis*), ДНК возбудителя туляремии (*F.tularensis*), ДНК возбудителя чумы (*Y.pestis*), ДНК возбудителя легионеллеза (*L.pneumophila*), ДНК возбудителей бруцеллеза (*B.abortus*, *B.melitensis* и *B.suis*), РНК вирусов Эбола вариант Заир (*EBOV Zaire*), и гриппа А в биологическом материале (цельная кровь, мазки из ротоглотки, мазки из полости носа, культуры микроорганизмов) и объектах окружающей среды (вода, почва) методом гибридизации на олигонуклеотидном микрочипе (ДНК-чипе). Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике. Материалом для проведения исследования служат пробы ДНК/РНК, экстрагированной из исследуемого материала.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на сибирскую язву, туляремию, чуму, легионеллез, бруцеллез, лихорадку Эбола или грипп А, вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на выявлении фрагментов нуклеиновых кислот возбудителей, которое проводится в несколько этапов:

- 1) экстракция ДНК/РНК из образцов исследуемого материала;
- 2) проведение реакции обратной транскрипции с пробами РНК, полученными на этапе экстракции;
- 3) ПЦР-амплификация участков ДНК/кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и термостабильной ДНК-зависимой ДНК-полимеразы;
- 4) транскрипция полученных в результате ПЦР фрагментов ДНК с помощью фермента ДНК-зависимой РНК-полимеразы и биотинилированных олигонуклеотидов;
- 5) гибридизация биотинилированных фрагментов РНК с иммобилизованными на поверхности ДНК-чипа комплементарными олигонуклеотидными зондами (см. табл. 1). Последующая обработка ДНК-чипа конъюгатом стрептавидина с флуорофором Cy5 позволяет регистрировать образование специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется с помощью флуоресцентного сканера или имиджера.

ПКО позволяет контролировать все этапы исследования и оценивать влияние ингибиторов на результаты.

Возбудитель	Олигонуклеотидный зонд	Мишень (область гибридизации)
<i>B. anthracis</i>	Ba1	Ген <i>pagA</i> плазмиды PXO1
	Ba3	Ген <i>capB</i> плазмиды PXO2
<i>F. tularensis</i>	Ft1	Гены <i>iglABCD</i>
	Ft2	Ген <i>fopA</i>
	Ft4	Участок гена RD1
<i>Y. pestis</i>	Yp2	Оперон <i>caf1</i> плазмиды pMT1
	Yp4	Оперон <i>caf2</i> плазмиды pMT1
	Yp6	Локус хромосомы <i>Y. pestis</i> , отсутствующий в хромосоме <i>Y. pseudotuberculosis</i>
<i>L. pneumophila</i>	Lp1	Ген <i>mip</i>
<i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> и <i>B. suis</i>	Bru1	Локус <i>WboA</i>
	Bru2	Локус <i>WboA</i>
	Bru4	Локус <i>WboA</i>
Вирус Эбола	EBOV	Ген I
Вирус гриппа A	IVA	Ген гемагглютинаина вируса гриппа A
	IVA_H1	Ген гемагглютинаина вируса гриппа A субтипа 1
	IVA_H5	Ген гемагглютинаина вируса гриппа A субтипа 5
	IVA_H7	Ген гемагглютинаина вируса гриппа A субтипа 7
	IVA_H9	Ген гемагглютинаина вируса гриппа A субтипа 9

ФОРМЫ КОМПЛЕКАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект ООИ-1»; «Комплект для транскрипции»; «Комплект для гибридизации ДНК-чип».

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК/кДНК методом ПЦР, транскрипции ПЦР-фрагментов и гибридизационно-флуоресцентной детекции с использованием ДНК-чипа. Для проведения полного исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции нуклеиновых кислот и обратной транскрипции РНК, рекомендованные Изготовителем.

Форма 1 рассчитана на проведение 48 реакций амплификации, транскрипции и гибридизации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объем экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл
при выявлении ДНК <i>B.anthraxis</i> , <i>F.tularensis</i> , <i>L.pneumophila</i> , <i>Y.pestis</i>			
Кровь	100	«РИБО-преп»	1000
Культуры микроорганизмов	100		1000
Вода	100		1000
Почвы	100		1000
при выявлении ДНК возбудителей бруцеллеза (<i>B.abortus</i> , <i>B.melitensis</i> и <i>B.suis</i>)			
Кровь	100	«РИБО-преп»	1000
Культуры микроорганизмов	100		1000
при выявлении РНК вируса Эбола (<i>EBOV Zaire</i>)			
Кровь	100	«РИБО-преп»	1000
при выявлении РНК вируса гриппа А (<i>Influenza virus A</i>)			
Мазки из ротоглотки	100	«РИБО-преп»	1000
Мазки из полости носа	100		1000
Культуры микроорганизмов	100		1000

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции нуклеиновых кислот».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов позволяет обнаружить фрагменты ДНК/РНК заявленных возбудителей. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании образцов ДНК следующих гетерологичных штаммов микроорганизмов *Bacillus cereus* 8, *Bacillus cereus* 751, *Bacillus subtilis* 35, *Bacillus subtilis* 56, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus globigii*, *Legionella micdadei*, *Yersinia enterocolitica* (штамм И-26-04), *Yersinia pseudotuberculosis* (штамм 4320), а также геномной ДНК человека.

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных организмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было. Информация об известных интерферирующих соединениях указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая чувствительность набора реагентов была изучена на модельных пробах биологического материала, искусственно контаминированных инаktivированными штаммами *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis*, *L. pneumophila*, *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*, вируса Эбола, вариант Заир, и вируса гриппа А.

Определение диагностической специфичности набора реагентов АмплиСенс® ДНК-чип ООИ-1 проводилось на образцах биологического материала (цельная кровь, мазки из ротоглотки, мазки из полости носа, смывы с питательной среды, вода и почва), отрицательных при исследовании наборами сравнения. Всего при исследовании диагностической чувствительности и специфичности было протестировано 840 образцов биологического материала – 590 положительных и 250 отрицательных.

Исследование проводилось в сравнении с наборами реагентов: «АмплиСенс® *Bacillus anthracis*-FRT» (ПУ № ФСП 2008/02417), «ОМ-Скрин-Туляремия-РВ» (ПУ № РЗН 2015/2866), «АмплиСенс® *Yersinia pestis*-FL» (ПУ № ФСП 2012/13303), «АмплиСенс® *Legionella pneumophila*-FL» (ПУ № ФСП 2010/07097), «АмплиСенс® *Brucella* spp.-FL» (ПУ № ФСП 2009/04212), «АмплиСенс® *EBOV* Zaire-FL» (ПУ № РЗН 2014/2036) и «АмплиСенс® *Influenza virus* А-тип-FL» (ПУ № ФСП 2010/08367). Дискордантных результатов выявлено не было.

Таблица 3

**Диагностические характеристики набора реагентов
для диагностики in vitro АмплиСенс® ДНК-чип ООИ-1**

Тип образцов	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале, %	Диагностическая специфичность, (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале, %
при выявлении ДНК <i>Bacillus anthracis</i>		
Цельная кровь	88,7 - 100	90,5 - 100
Культуры микроорганизмов	88,7 - 100	86,1 - 100
Вода	88,7 - 100	86,1 - 100
Почва	88,7 - 100	86,1 - 100
при выявлении ДНК <i>Francisella tularensis</i>		
Цельная кровь	88,7 - 100	90,5 - 100
Культуры микроорганизмов	88,7 - 100	86,1 - 100
Вода	88,7 - 100	86,1 - 100
Почва	88,7 - 100	86,1 - 100
при выявлении ДНК <i>Yersinia pestis</i>		
Цельная кровь	88,7 - 100	90,5 - 100
Культуры микроорганизмов	88,7 - 100	86,1 - 100
Вода	88,7 - 100	86,1 - 100
Почва	88,7 - 100	86,1 - 100
при выявлении ДНК <i>Legionella pneumophila</i>		
Цельная кровь	88,7 - 100	90,5 - 100
Культуры микроорганизмов	88,7 - 100	86,1 - 100
Вода	88,7 - 100	86,1 - 100
Почва	88,7 - 100	86,1 - 100
при выявлении ДНК <i>Brucella abortus</i>, <i>Brucella melitensis</i>, <i>Brucella suis</i>		
Цельная кровь	96,1 - 100	90,5 - 100
Культуры микроорганизмов	96,1 - 100	86,1 - 100

Тип образцов	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале, %	Диагностическая специфичность, (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале, %
при выявлении РНК вируса Эбола вариант Заир		
Цельная кровь	88,7 - 100	90,5 - 100
при выявлении РНК вируса гриппа А		
Мазки из полости носа	88,7 - 100	90,5 - 100
Мазки из ротоглотки	88,7 - 100	90,5 - 100
Культуры микроорганизмов	88,7 - 100	86,1 - 100

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28°C, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку¹, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

¹ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Обеззараживать отходы, образовавшиеся в процессе предварительной подготовки проб и проведении исследования, а также неиспользованный исследуемый материал, в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром². 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 постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или 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 одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

² Для удаления жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

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

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ПУ № ФСР 2009/05011) для взятия, транспортировки и хранения мазков из верхних дыхательных путей.
2. Вакуумная система забора крови Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия или аналогичные).
3. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).
4. Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у детей.
5. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых.
6. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы), в индивидуальной упаковке, стерильный (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания) – зонд для взятия мазков из ротоглотки и жидкости из полости среднего уха у детей и

взрослых (допустимо использовать для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых).

7. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
8. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или 0,01 М калий-фосфатный буфер, pH 7,0.
9. 70 % раствор этанола для взятия образцов почвы.

Предварительная подготовка исследуемого материала

10. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буфер (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2).
11. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
12. Закручивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
13. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
14. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и/или 5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
15. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
16. Центрифуга для пробирок на 15 и 50 мл с максимальной скоростью центрифугирования не менее 7 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн») США, или аналогичная).
17. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
18. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
19. Холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16°C.
20. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
21. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.
22. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

Экстракция ДНК/РНК из исследуемого материала

- 23.Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК – «РИБО-преп» (ПУ ФСР 2008/03147) или другие комплекты, рекомендованные Изготовителем.
- 24.Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК/ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК/ДНК.

Обратная транскрипция

- 25.Комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции «РЕВЕРТА-L» (ПУ № ФСР 2008/03994)
- 26.Дополнительные материалы и оборудование для проведения реакции обратной транскрипции – согласно инструкции к комплекту реагентов для проведения реакции обратной транскрипции.

Амплификация

- 27.Завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.
- 28.Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США или аналогичные) – для амплификаторов, адаптированных для пробирок объемом 0,5 мл (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия)).
- 29.Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные):
- 30.Штативы для пробирок объемом 0,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
- 31.Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
- 32.Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
- 33.Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
- 34.Амплификатор (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия).
- 35.Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
- 36.Холодильник от 2 до 8°С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16°С.
- 37.Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
- 38.Емкость для сброса наконечников.

Транскрипция

- 39.Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США или аналогичные) – для амплификаторов,

адаптированных для пробирок объемом 0,5 мл (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия)).

40. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

41. Штативы для пробирок объемом 0,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

42. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

43. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

44. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).

45. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

46. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

47. Емкость для сброса наконечников.

48. Холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16°C.

Проведение реакции гибридизации на ДНК-чипе

49. Дистиллированная вода.

50. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

51. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

52. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

53. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся пробирки на 5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

54. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

55. Штативы для пробирок объемом 0,5 мл, 1,5 мл, 5 мл и 50 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

56. Рамка-трафарет для слайдов (например, FAST slide 16 wells incubation chamber («Фаст слайд 16 велз инкубэйшн чэмбер»), SigmaAldrich («СигмаОлдрич»), США, или аналогичная).

57. Рамка-держатель для слайдов (например, «FAST Fame» («Фаст Фэйм»),

SigmaAldrich («СигмаОлдрич»), США, или аналогичная).

58. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
59. Центрифуга с ротором для пробирок объемом 50 мл (например, LMC-3000, ротор R-6, Biosan («Биосан»), Латвия, или аналогичная).
60. Термошейкер (например, PST-60HL, Biosan («Биосан»), Латвия, или аналогичный).
61. Вакуумный медицинский отсасыватель (например, ОМ-1, АО «УКБП», Россия, или аналогичный).
62. Сканер для биочипов - MarS, Dtabis, Германия с прилагаемым к нему ПО SpotScout Pro.
63. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
64. Емкость для сброса наконечников.
65. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- цельная кровь,
- мазки из ротоглотки или полости носа,
- культуры микроорганизмов,
- объекты окружающей среды (вода, почва).

Цельная кровь

Для получения образцов цельной крови забор крови проводят утром натощак в пробирку (специальную вакуумную систему) с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов цельной крови до проведения исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 2 часов.
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 12 часов;

Не допускается замораживание материала!

Мазки из ротоглотки

Перед получением мазков из ротоглотки проводят трехкратное полоскание полости рта физиологическим раствором. Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После забора материала тампон (рабочую часть зонда с тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл

транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

Допускается хранение образцов материала:

- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – в течение 1 недели;

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки из полости носа

Мазки из полости носа берут сухими стерильными зондами с тампонами. Зонд с тампоном вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. После забора материала тампон (рабочую часть зонда с тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

Допускается хранение образцов материала:

- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – в течение 1 недели;

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ВНИМАНИЕ! Рекомендуется совмещать мазки из полости носа и ротоглотки в одной пробирке. Для этого рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 500 мкл транспортной среды и исследуются как один образец.

Культуры микроорганизмов

Для получения образца культуры микроорганизмов для исследования колонии микроорганизмов необходимо ресуспендировать в 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатном буферном растворе, pH 7,0.

Допускается хранение образцов материала:

- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °C – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Образцы почвы

Для получения образцов почвы в пробирки на 5 мл с плотно закрывающейся

(завинчивающейся) крышкой отдельным шпателем (или одноразовыми лопатками) вносят по 0,4-1,0 г (около 1,0 мл) земли, заливают равным объемом 70 % этанола и выдерживают в течение 10 мин.

Допускается хранение образцов почвы:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Образцы воды

Для анализа отбирают образцы сточной воды, воды из водоема, питьевой воды в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный контейнер объемом 50-60 мл.

Допускается хранение образцов воды:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК/РНК

Образцы цельной крови требуют предварительной подготовки.

В одноразовую полипропиленовую завинчивающуюся или плотно закрывающуюся пробирку на 1,5 мл вносят 1,5 мл цельной крови с ЭДТА, и центрифугируют при 800 об/мин (380 g при диаметре ротора 50 мм) в течение 10 мин; затем верхний слой плазмы (500-600 мкл) с лейкоцитами переносят в новую одноразовую полипропиленовую завинчивающуюся или плотно закрывающуюся пробирку на 1,5 мл и центрифугируют при 8000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (за исключением 100 мкл жидкости над осадком клеток) переносят в контейнер с дезраствором, а осадок клеток и 100 мкл надосадочной жидкости используют для экстракции ДНК/РНК.

Допускается хранение полученной фракции цельной крови:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки из ротоглотки и/или полости носа требуют предварительной подготовки.

Перед экстракцией ДНК/РНК содержимое закрытой пробирки перемешивают на

вortexe и центрифугируют в течение 5 секунд при 5 тыс об/мин для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.

Культуры микроорганизмов требуют предварительной подготовки.

Перед экстракцией ДНК/РНК необходимо провести центрифугирование суспензий культур микроорганизмов при 12000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удалить в емкость с дезинфицирующим раствором, осадок ресуспендировать в 50 мкл 0,9% раствора натрия хлорида. Для исследования используют 50 мкл суспензии.

Допускается хранение полученных концентрированных суспензий культур микроорганизмов:

- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – в течение 1 недели;

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Образцы почвы

Перед экстракцией ДНК/РНК в каждую пробирку с образцом почвы вносят по 3 мл физиологического раствора, тщательно перемешивают и декантируют в течение 5 минут. Из пробирок с декантированной землей переносят по 1 мл раствора и осаждают грубодисперсную фракцию центрифугированием на микроцентрифуге в течение 2-3 минут при 3000 g (2000 об/мин при радиусе ротора 70 мм). 100 мкл осветленной надосадочной жидкости используют для последующей экстракции ДНК/РНК.

Допускается хранение полученной осветленной надосадочной жидкости:

- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – в течение 1 недели;

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Образцы воды

Перед экстракцией ДНК/РНК 10 мл воды центрифугируют в течение 15 минут при 7000 g (например 7500 об/мин для центрифуги 5430, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»)). Надосадочную жидкость (за исключением 100 мкл жидкости над осадком) переносят в контейнер с дезраствором, а осадок и 100 мкл надосадочной жидкости используют для экстракции ДНК/РНК.

Допускается хранение полученной суспензии:

- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – в течение 1 недели;

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Непригодными для исследования являются образцы плазмы крови, если кровь была взята в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

Сведения о других интерферирующих веществах при условии соблюдения правил взятия и предварительной подготовки исследуемого материалах, указанных в инструкции, отсутствуют.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК/РНК из исследуемых образцов;
- обратная транскрипция РНК;
- ПЦР-амплификация фрагментов ДНК и кДНК со специфическими олигонуклеотидами;
- транскрипция РНК на полученной матрице фрагментов ДНК;
- гибридизация полученных фрагментов РНК с иммобилизованными на поверхности ДНК-чипа олигонуклеотидными зондами;
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала)

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК/РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Для экстракции ДНК/РНК используется комплект реагентов «РИБО-преп». Порядок работы смотрите в инструкции к комплекту реагентов.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Объем исследуемого образца – **100 мкл.**

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО.**

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО и 10 мкл ПК ООИ-1.**

Объем элюции – **50 мкл.**

ВНИМАНИЕ! После проведения элюции полученный материал ДНК/РНК разделить на 2 части по 25 мкл. Одну часть использовать для проведения ПЦР сразу, вторую – после проведения реакции обратной транскрипции (ОТ).

ВНИМАНИЕ! Реакцию ОТ рекомендуется проводить сразу после получения проб ДНК/РНК. Допускается хранение проб при температуре от 2 до 8 °С не более 30 мин, при температуре от минус 24 до минус 16 °С не более недели и при температуре не выше минус 68 °С до года. Допускается только однократное замораживание-оттаивание проб РНК.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ

(проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения ОТ и ПЦР)

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Для обратной транскрипции РНК используется комплект реагентов «РЕВЕРТА-L». Порядок работы смотрите в инструкции к комплекту реагентов.

Объемы реагентов и образцов при проведении 1 реакции обратной транскрипции с помощью комплекта реагентов «РЕВЕРТА-L»:

Объем РНК-пробы – **10 мкл.**

Объем готовой реакционной смеси (содержит RT-mix, RT-G-mix-1, ревертазу (MMIv)) – **10 мкл.**

Общий объем реакции – **20 мкл.**

Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК для последующей постановки ПЦР развести в 2 раза ДНК-буфером (к 20 мкл кДНК отдельным наконечником с фильтром добавить 20 мкл ДНК-буфера, перемешать на вортексе и осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием (1-3 с)).

Готовый препарат кДНК можно хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 недели или при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект ООИ-1». Комплект реагентов используется для проведения ПЦР-амплификации участков ДНК/кДНК *B.anthraxis*, *F.tularensis*, *Y.pestis*, *L.pneumophila*, возбудителей бруцеллеза, вирусов Эбола вариант Заир (*EBOV Zaire*), и гриппа А (*Influenza virus A*). Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1 ООИ-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ПЦР-смесь-2 blue	Жидкость синего цвета	1,2	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Вязкая бесцветная жидкость	4,0	1 флакон
Воск для ПЦР	Твердое вещество белого цвета	1,3	2 пробирки
Бетаин	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
К+ ООИ-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,05	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,05	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций, включая контрольные образцы.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции ДНК/РНК из биологического материала:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПКО ООИ-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

«Комплект для транскрипции». Комплект реагентов используется для проведения реакции транскрипции – синтеза молекул РНК на матрице ДНК, полученных в результате ПЦР-амплификации фрагментов ДНК/кДНК *B.anthraxis*, *F.tularensis*, *Y.pestis*, *L.pneumophila*, возбудителей бруцеллеза, вирусов Эбола вариант Заир (*EBOV Zaire*) и гриппа А (*Influenza virus A*). Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
5x Буфер для транскрипции	Прозрачная жидкость светло-желтого цвета или бесцветная	0,5	1 пробирка
Смесь НТФ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
T7-РНК-полимераза	Прозрачная бесцветная или слегка опалесцирующая жидкость	0,1	1 пробирка
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	1,8	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 48 реакций, включая контрольные образцы.

«Комплект для гибридизации ДНК-чип». Комплект реагентов используется для проведения гибридизации на ДНК-чипах. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ДНК-чип ООИ-1	Микроскопный слайд размером 25±1мм шириной, 75±1мм длиной, 1±0.2мм высотой	-	4 слайда в пластмассовом боксе
Концентрат конъюгата	Слегка вязкая жидкость светло-голубого цвета	0,05	1 пробирка
2х Буфер для гибридизации	Прозрачная бесцветная жидкость ³	2,0	1 пробирка
Твин-20	Вязкая жидкость светло-желтого цвета	0,15	1 пробирка
20х SSC	Прозрачная бесцветная жидкость	3,0	1 пробирка
10х Раствор для отмывки	Прозрачная бесцветная жидкость ⁴	1,5	1 пробирка
Раствор для разведения концентрата конъюгата	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	27	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на проведение 48 реакций, включая контрольные образцы.

ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ

(проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения ОТ и ПЦР)

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК/кДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Выбор пробирок для амплификации зависит от типа амплификатора.

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК/кДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, объем пробы ДНК/кДНК – 5 мкл.

1. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-1 ООИ-1. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
2. Пробирку с воском для ПЦР прогреть в термостате при температуре 95°C до полного расплавления.

³ Допустимо образование кристаллического осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °C.

3. Отобрать необходимое количество пробирок для ПЦР-амплификации ДНК/кДНК исследуемых и контрольных образцов. Необходимо обратить внимание на то, что для каждого исследуемого образца следует приготовить по две пробирки: для образца ДНК после этапа экстракции нуклеиновых кислот и для образца кДНК после этапа обратной транскрипции.
4. Внести на дно приготовленных пробирок по **5 мкл ПЦР-смеси-1 ООИ-1**. Сверху добавить по капле (примерно **10-15 мкл**) расплавленного **воска** так, чтобы он полностью накрыл жидкость, закрыть крышки пробирок. Пробирки с разлитой ПЦР-смесью-1 и воском можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 недели.
5. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь 1. Для этого смешать компоненты из расчета на 1 реакцию в следующем соотношении: **10 мкл ПЦР-смеси-2 blue, 5 мкл Бетаина**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 8) плюс запас на одну реакцию.
6. Перемешать реакционную смесь 1 и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
7. Внести в каждую пробирку с ПЦР-смесью-1 ООИ-1 **на поверхность застывшего воска по 15 мкл реакционной смеси 1**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1 ООИ-1. При использовании амплификатора без термостатируемой крышки сверху добавить по **1 капле минерального масла для ПЦР**.
8. Промаркировать пробирки.
9. В случае хранения образцов ДНК/кДНК, пробирки необходимо встряхнуть и осадить на вортексе.
10. В подготовленные пробирки внести по **5 мкл проб ДНК** или по **5 мкл проб кДНК**, полученных из исследуемых и контрольных образцов в результате экстракции или обратной транскрипции, соответственно.
11. Поставить контрольные реакции.
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **5 мкл К+ ООИ-1**.
 - б) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **5 мкл К-**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **5 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **5 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО ООИ-1**.

ВНИМАНИЕ! Перед постановкой амплификации рекомендуется осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

12. Запрограммировать амплификатор для выполнения программы амплификации (таблица 4).

Таблица 4

Программа амплификации

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	94	1 мин	1
2	94	15 с	40
	53	25 с	
	72	25 с	
3	72	2 мин	1
4	4	хранение	

13. Установить пробирки в ячейки амплификатора и запустить программу амплификации.

14. По окончании выполнения программы пробирки отправить в помещение для транскрипции и гибридизации (**ЗОНУ 3**).

Допускается хранение продуктов амплификации:

- при температуре от 18 до 25 °C – в течение 16 часов;
- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 1 недели;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – длительно.

ТРАНСКРИПЦИЯ

(проводится в **ЗОНЕ 3** – помещении для детекции продуктов амплификации в ПЦР-боксе или в вытяжном шкафу, при наличии в нем локального источника УФ-света)

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной кДНК/ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК/РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Перед проведением транскрипции необходимо объединить пробы, относящиеся к одному исследуемому образцу (см. п. 3 раздела ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ).

Перемешать полученную смесь и осадить капли кратковременным

центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса. Таким образом, в одной пробирке будут находиться продукты амплификации как участков ДНК, так и участков кДНК.

Для внесения в пробирки реагентов и продуктов амплификации используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Общий объем реакционной смеси – 50 мкл, объем пробы продуктов ПЦР-амплификации – 20 мкл.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением транскрипции.

1. Разморозить комплект реагентов для проведения реакции транскрипции.
2. Перемешать содержимое всех реагентов для транскрипции, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь 2. Для этого смешать компоненты из расчета на 1 реакцию в следующем соотношении: **10 мкл 5х Буфера для транскрипции, 10 мкл смеси НТФ, 8 мкл H₂O стерильной, 2 мкл Т7-РНК-полимеразы**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов, плюс запас на одну реакцию. Осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок для проведения транскрипции исследуемых и контрольных проб.
5. Промаркировать пробирки.
6. Внести в приготовленные пробирки для транскрипции по **30 мкл реакционной смеси 2**.
7. Добавить по **20 мкл продуктов амплификации** исследуемых и контрольных проб, полученных на предыдущем этапе. Осторожно перемешать пипетированием.
8. Осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе.
9. Запрограммировать термостат на 37 °С. Запустить термостат.
10. Когда температура достигнет 37 °С, поместить пробирки в термостат, закрыть крышку прибора.
11. Оставить пробирки в термостате на 60 минут. По окончании выполнения программы приступить к этапу гибридизации.

Допускается хранение продуктов транскрипции при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели.

ГИБРИДИЗАЦИЯ

(проводится в ЗОНЕ 3 – помещении для детекции продуктов амплификации в

ПЦР-боксе или в вытяжном шкафу, при наличии в нем локального источника УФ-света)

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной кДНК/ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК/РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Для внесения в пробирки реагентов и продуктов транскрипции используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Приготовление растворов

ВНИМАНИЕ! Все растворы необходимо отбирать одноразовыми наконечниками.

Приготовить растворы для гибридизации необходимого числа ДНК-чипов, в соответствии с табл. 5.

Таблица 5

**Объемы реагентов для проведения анализа
на необходимом количестве ДНК-чипов**

Название раствора	Используемые реагенты	Количество ДНК-чипов в одной постановке			
		1	2	3	4
		Объем реагентов, мл			
Буфер 1	20x SSC	0,35	0,65	0,95	1,25
	Твин-20	0,014	0,026	0,038	0,05
	H ₂ O стерильная	1,04	1,93	2,82	3,7
Буфер 2	20x SSC	0,14	0,26	0,38	0,5
	Твин-20	0,014	0,026	0,038	0,05
	H ₂ O стерильная	1,26	2,32	3,38	4,45
Буфер 3	20x SSC	0,14	0,26	0,38	0,5
	H ₂ O стерильная	1,26	2,34	3,42	4,5
Рабочий раствор конъюгата	Концентрат конъюгата	0,012	0,024	0,036	0,048
	Раствор для разведения концентрата конъюгата	1,2	2,4	3,6	4,8
Рабочий раствор для отмывки	10x Раствор для отмывки	0,26	0,5	0,75	1,0
	H ₂ O стерильная	2,34	4,5	6,75	9,0

Буферы 1 – 3 и рабочий раствор для отмывки хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток.

Рабочий раствор конъюгата готовить перед использованием за 10-20 мин до его внесения. Хранить не более 2 часов при температуре от 18 до 25 °С, в защищенном от света месте.

Б. Проведение гибридизации

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением гибридизации.

Общий объем реакционной смеси – 80 мкл, включая объем пробы продуктов транскрипции – 10 мкл

1. Вскрыть фольгированный пакет и извлечь из пластмассового бокса необходимое количество **ДНК-чипов**. В ходе работы необходимо держать слайды за боковую поверхность или матовое поле, не касаясь рабочего поля чипа. Неиспользованные ДНК-чипы оставить в закрытом пластмассовом боксе в фольгированном пакете, при этом пакет следует плотно закрыть с помощью скрепки, предварительно свернув край пакета 2-3 раза. Осушитель (силикагель) из пакета не удалять!
2. Сверху на ДНК-чип (на стороне маркировки) наложить 16-луночный трафарет для предотвращения контаминации образцов. Вставить ДНК-чипы с надетыми на них трафаретами в рамку-держатель для слайдов.

ВНИМАНИЕ! Запрещается наносить на поверхность ДНК-чипов какие-либо отметки.

3. Перемешать реагенты для гибридизации, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,5 мл для проведения гибридизации исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в приготовленные пробирки по **40 мкл 2х буфера для гибридизации, 30 мкл H₂O стерильной и 10 мкл продуктов транскрипции** исследуемых и контрольных проб, полученных на предыдущем этапе.
6. Пробирки прогреть в термостате при 80 °С в течение 2 минут.
7. Перед постановкой гибридизации осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).
8. Запрограммировать термошейкер для планшетов на 37 °С.
9. Внести в эрреи (лунки рамки-трафарета) ДНК-чипа **80 мкл предварительно прогретых смесей, содержащих продукты транскрипции**. Рамку-держатель накрыть крышкой. Поместить в термошейкер.
10. Инкубировать ДНК-чипы в термошейкере в течение 60 минут при температуре 37 °С и при скорости вращения платформы 300 об/мин.
11. После инкубации аккуратно удалить содержимое лунок рамки-трафарета с

помощью вакуумного медицинского отсасывателя и отдельного наконечника для каждого эррея, не повреждая центральное поле эррея.

- 12.Внести в каждый эррей по **100 мкл Буфера 1**. Рамку-держатель накрыть крышкой. Поместить в термошейкер.
- 13.Инкубировать ДНК-чипы в термошейкере в течение 7 минут при температуре 37 °С и при скорости вращения платформы 300 об/мин.
- 14.После инкубации аккуратно удалить содержимое лунок рамки-трафарета с помощью вакуумного медицинского отсасывателя, не повреждая центральное поле эррея.
- 15.Внести в каждый эррей по **100 мкл Буфера 2**. Рамку-держатель накрыть крышкой. Поместить в термошейкер.
- 16.Инкубировать ДНК-чипы в термошейкере в течение 7 минут при температуре 37 °С и при скорости вращения платформы 300 об/мин.
- 17.После инкубации аккуратно удалить содержимое лунок рамки-трафарета с помощью вакуумного медицинского отсасывателя, не повреждая центральное поле эррея.
- 18.Внести в каждый эррей по **100 мкл Буфера 3**. Рамку-держатель накрыть крышкой. Поместить в термошейкер.
- 19.Инкубировать ДНК-чипы в термошейкере в течение 7 минут при температуре 37 °С и при скорости вращения платформы 300 об/мин.
- 20.После инкубации аккуратно удалить содержимое лунок рамки-трафарета с помощью вакуумного медицинского отсасывателя, не повреждая центральное поле эррея.
- 21.Внести в каждый эррей по **90 мкл рабочего раствора конъюгата**. Рамку-держатель накрыть крышкой. Поместить в термошейкер.
- 22.Инкубировать ДНК-чипы в термошейкере в течение 30 минут при температуре 37 °С и при скорости вращения платформы 300 об/мин.
- 23.После инкубации аккуратно удалить содержимое лунок рамки-трафарета с помощью вакуумного медицинского отсасывателя, не повреждая центральное поле эррея.
- 24.Внести в каждый эррей по **100 мкл рабочего раствора для отмывки**. Рамку-держатель накрыть крышкой. Поместить в термошейкер.
- 25.Инкубировать ДНК-чипы в термошейкере в течение 2 минут при температуре 37 °С и при скорости вращения платформы 300 об/мин.
- 26.После инкубации аккуратно удалить содержимое лунок рамки-трафарета с помощью вакуумного медицинского отсасывателя, не повреждая центральное

поле эррея.

27. Повторить отмывку, следуя пп. 24-26.

28. Вынуть ДНК-чипы с надетыми на них рамками-трафаретами из рамки-держателя.

Снять рамку-трафарет с каждого ДНК-чипа.

29. Каждый ДНК-чип ополоснуть 70-100 мл дистиллированной воды.

30. Сбросить капли с ДНК-чипов центрифугированием в течение 1 мин при 1000 об/мин.

31. Перейти к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. ДНК-чипы после проведения гибридизации сканировать на многоканальном флуоресцентном сканере для биочипов, активируя канал Cy5 с разрешением 10 мкм/пкс.
2. Полученные результаты сканирования, отражающие специфические сигналы флуоресценции каждого спота⁴ и фоновые значения на эррее⁵, в виде выходных файлов сохранить в формате TIFF.
3. Сканированные образы в формате TIFF открыть в программе для последующей интерпретации изображения, например, SpotScout Pro (прилагается к сканеру для биочипов MarS, Ditabis). На каждый эррей наложить сетку по размеру эррея и спотов (кроме границы эррея). Обработать изображения и сохранить полученные результаты в формате Excel.
4. Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) в точках (спотах), соответствующих иммобилизованным олигонуклеотидным зондам, комплементарным фрагментам последовательности ДНК/РНК возбудителей, сигнала флуоресценции, превышающего пороговое значение. Расположение спотов на эррее и эрреев на ДНК-чипе представлено в таблицах 6 и 7.

ВНИМАНИЕ! Параметры для обсчета и пороговые значения сигналов флуоресценции по каждому олигонуклеотидному зонду указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

⁴ Спот – индивидуальная точка на эррее.

⁵ Эррей – ограниченная зона на поверхности чипа для постановки одного клинического/контрольного образца, содержащая набор иммобилизованных молекул ДНК или РНК и вспомогательных маркерных белков, молекул ДНК или РНК в виде индивидуальных спотов (точек).

Таблица 6

Дизайн эррея ДНК-чипа

(1) Ft1	(2) Ft2	(3) Ft4	(4) Yp2	(5) Yp4	(6) Yp6	(7) Bru1	(8) Bru2	(9) Bru4	маркер
(1) Ft1	(2) Ft2	(3) Ft4	(4) Yp2	(5) Yp4	(6) Yp6	(7) Bru1	(8) Bru2	(9) Bru4	маркер
(1) Ft1	(2) Ft2	(3) Ft4	(4) Yp2	(5) Yp4	(6) Yp6	(7) Bru1	(8) Bru2	(9) Bru4	маркер
(10) Lp1	(11) Ba1	(12) Ba3	(13) EBOV	(14) IVA	(15) IVA_H1	(16) IVA_H5	(17) IVA_H7	(18) IVA_H9	маркер
(10) Lp1	(11) Ba1	(12) Ba3	(13) EBOV	(14) IVA	(15) IVA_H1	(16) IVA_H5	(17) IVA_H7	(18) IVA_H9	маркер
(10) Lp1	(11) Ba1	(12) Ba3	(13) EBOV	(14) IVA	(15) IVA_H1	(16) IVA_H5	(17) IVA_H7	(18) IVA_H9	маркер
(19) Нет зондов	(20) Нет зондов	(21) Нет зондов	(22) Нет зондов	(23) Нет зондов	(24) Нет зондов	(25) Нет зондов	(26) Нет зондов	(27) буфер	маркер
(19) Нет зондов	(20) Нет зондов	(21) Нет зондов	(22) Нет зондов	(23) Нет зондов	(24) Нет зондов	(25) Нет зондов	(26) Нет зондов	(27) буфер	маркер
(19) Нет зондов	(20) Нет зондов	(21) Нет зондов	(22) Нет зондов	(23) Нет зондов	(24) Нет зондов	(25) Нет зондов	(26) Нет зондов	(27) буфер	маркер
маркер	маркер	маркер	маркер	маркер	маркер	маркер	маркер	маркер	маркер

Таблица 7

Расположение эрреев (образцов) на ДНК-чипе

1	7
2	8
3	9
4	10
5	11
6	12

Критерии оценки валидности и достоверности анализа:

Результат анализа эррея считают **валидным***, если на ДНК-чипе на канале Cy5 визуально наблюдают флуоресцирующие споты в положениях, соответствующих маркерам границы эррея. Значения сигналов флуоресценции маркеров границы эррея должно быть не менее 1000. Сигнал флуоресценции оценивается вручну при

наведении курсора на споты, соответствующие маркерам эррея. Оценку проводят в процессе сканирования ДНК-чипа.

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК.

Далее оценивают результаты в формате Excel.

Учет результатов для каждого олигонуклеотидного зонда проводится минимум по двум повторам (спотам) из трех.

Результат исследования считается **достоверным****, если:

- значения сигналов флуоресценции для всех олигонуклеотидных зондов на эррее с внесенным отрицательным контролем не превышают пороговых значений, указанных во вкладыше;
- значения сигналов флуоресценции для олигонуклеотидных зондов на эррее с внесенными положительными контрольными образцами превышают более чем на 200 пунктов пороговые значения.

** В случае получения **недостоверного результата** необходимо повторить исследование всех образцов, начиная с этапа гибридизации на **ДНК-чипе ООИ-1**.

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов:

Далее проводят интерпретацию результатов на наличие ДНК *B.anthraxis*, *F.tularensis*, *Y.pestis*, *B.abortus* и *L.pneumophila*, а также РНК вируса Эбола и вируса гриппа А (*Influenza virus A*) в исследуемом образце.

Если для определенного олигонуклеотидного зонда значение сигнала флуоресценции как минимум для двух из трех спотов превышает пороговое значение более чем на 200 пунктов, то результат гибридизации на ДНК-чипе считают **положительным** по соответствующему возбудителю.

Если для определенного олигонуклеотидного зонда значение сигнала флуоресценции как минимум для двух из трех спотов не превышает пороговое значение, то результат гибридизации на ДНК-чипе считают **отрицательным** по соответствующему возбудителю.

Если для определенного олигонуклеотидного зонда как минимум для двух из трех спотов значение сигнала флуоресценции превышает пороговое значение менее чем на 200 пунктов, то результат считается **сомнительным**.

В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

Возбудитель сибирской язвы

Используемые в реакции зонды комплементарны последовательностям участков генов *pagA* плазмиды рХО1 (зонд **Ba1**) и *capB* плазмиды рХО2 (зонд **Ba3**) *B.anthraxis*. Полноценные штаммы сибиреязвенного микроба несут обе плазмиды рХО1 и рХО2. Вакцинный штамм СТИ-1 *B.anthraxis* имеет только плазмиду рХО1. Штаммы возбудителя сибирской язвы, лишенные плазмиды рХО2, могут выделяться из объектов окружающей среды. Случаи выделения культур *B.anthraxis*, не имеющих плазмиду рХО1, редки. При исследовании проб, подозрительных на зараженность сибиреязвенным микробом, могут быть отмечены следующие результаты:

- наличие положительного сигнала одновременно в спотах, соответствующих зондам **Ba1** и **Ba3**, – обнаружение вирулентного штамма *B.anthraxis* (рХО1+, рХО2+);
- наличие положительного сигнала в спотах, соответствующих зонду **Ba3** при отсутствии сигнала в спотах, соответствующих зонду **Ba1** - обнаружение штамма *B.anthraxis* (рХО1-, рХО2+);
- наличие положительного сигнала в спотах, соответствующих зонду **Ba1** при отсутствии сигнала в спотах, соответствующих зонду **Ba3**, - обнаружение штамма *B.anthraxis* (рХО1+, рХО2-).

Возбудитель легионеллёза

Зонд **Lp1** для детекции *L.pneumophila* соответствует фрагменту гена *mip*, обуславливающему патогенность возбудителя.

Наличие положительного сигнала в спотах, соответствующих зонду **Lp1**, свидетельствует о наличии в исследуемом образце ДНК возбудителя легионеллёза, *L.pneumophila*.

Возбудитель чумы

Используемые в реакции зонды комплементарны последовательностям участков генов *Y.pestis*. **Yp2** – зонд в пределах оперона *caf1* на плазмиде рMT1, **Yp4** - зонд в пределах оперона *caf2* на плазмиде рMT1, **Yp6** – зонд в пределах локуса на хромосоме *Y.pestis*, отсутствующего в хромосоме *Y.pseudotuberculosis*.

Положительное значение уровня флуоресценции для любого из трёх зондов - **Yp2**, **Yp4**, **Yp6** - свидетельствует о наличии в исследуемом материале ДНК *Y.pestis*.

Возбудитель бруцеллёза

Зонды **Bru1**, **Bru2** и **Bru4**, иммобилизованные на поверхности ДНК-чипа, комплементарны локусу *WboA*, отвечающему за синтез поверхностного антигена, идентичного у возбудителей *B.abortus*, *B.melitensis* и *B.suis*.

Положительное значение уровня флюоресценции любого из трёх зондов свидетельствует о наличии в исследуемом материале ДНК патогенных представителей рода *Brucella*.

Возбудитель туляремии

Используемые в реакции зонды комплементарны последовательностям участков следующих генов:

- *iglABCD* – гены, отвечающие за синтез белков, необходимых для персистенции возбудителя в макрофагах (зонд **Ft1**);
- *forA* – ген, кодирующий белок наружной мембраны (зонд **Ft2**);
- RD1 – участок гена, общий для всех подвидов, одна из областей дифференциации туляремийного микроба, имеющая делеции, специфичные для подвидов возбудителя туляремии (зонд **Ft4**).

Все указанные гены являются видоспецифичными. Имеются данные об инактивации у ряда штаммов генов *iglC*, что приводило к снижению вирулентности туляремийного микроба.

При исследовании проб, подозрительных на зараженность туляремийным микробом, могут быть отмечены следующие результаты:

- наличие положительного сигнала одновременно в спотах, соответствующих зондам **Ft2** и **Ft4**, в сочетании или без положительных значений для зонда **Ft1**, – обнаружение *F.tularensis*;
- наличие положительного сигнала в спотах, соответствующих зондам **Ft2** или **Ft4**, - регистрация сомнительного результата.

Вирius гриппа А

Используемые в реакции гибридизации зонды подобраны на гены гемагглютининов вируса гриппа А (зонд **IVA**). Кроме того, данные зонды позволяют дифференциально детектировать гемагглютинины вируса гриппа А разных субтипов (пандемического вируса 2009 года свиного происхождения (зонд **IVA_H1**), пятого (зонд **IVA_H5**), седьмого (зонд **IVA_H7**) и девятого (зонд **IVA_H9**) субтипов вируса гриппа птиц).

При исследовании проб, подозрительных на зараженность вирусом гриппа, могут быть отмечены следующие результаты:

- наличие положительного сигнала в спотах, соответствующих зонду **IVA** – наличие в пробе вируса гриппа А;
- наличие положительного сигнала в спотах, соответствующих зонду **IVA_H1** - наличие в пробе пандемического вируса 2009 года свиного происхождения (Influenza virus A/H1-swine или A/H1N1pdm09);

- наличие положительного сигнала в спотах, соответствующих одному из зондов **IVA_H5, IVA_H7, IVA_H9** - наличие в пробе вируса гриппа птиц, обладающего гемагглютинином субтипа 5, 7 или 9, соответственно (*Influenza virus A/H5-avian*, *Influenza virus A/H7-avian*, *Influenza virus A/H9-avian*, соответственно).

Вирус Эбола

Используемый в реакции зонд **EBOV** комплементарен последовательности участка гена I, отвечающего за синтез полимеразы вируса Эбола варианта Zaire.

Наличие положительного сигнала в спотах, соответствующих зонду **EBOV**, свидетельствует о наличии в исследуемом образце РНК вируса Эбола.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 6 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Набор реагентов при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. «ПЦР-комплект ООИ-1» хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-1 ООИ-1. ПЦР-смесь-1 ООИ-1 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

«Комплект для транскрипции» хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

«Комплект для гибридизации ДНК-чип» хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ДНК-чипа ООИ-1 и Концентрата конъюгата. ДНК-чип ООИ-1 и Концентрат конъюгата хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ДНК-чип ООИ-1 хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте. Концентрат конъюгата хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru⁶.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется

⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Использовать до



Код партии



Обратитесь к инструкции по применению



Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Беречь от влаги



Температурный диапазон



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению



Изготовитель



Дата изготовления

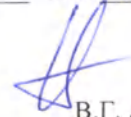


Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов

Прожито, пронумеровано и скреплено печатью: 36

тридцать шесть лист 08

Директор ФБУН ЦНИИ
Эпидемиологии
Роспотребнадзора


В.Г. Акимкин



20 19 г.