

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ЗАО «Синтол»

А.Кузубов

«20» февраля 2016 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению «Набора реагентов для генетического типирования
штаммов возбудителя брюшного тифа методом фрагментного анализа
(ОМ-Брюшной тиф-Генотип)» по ТУ 9398-019-46395995-2013**

2016

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное название набора

«Набор реагентов для генетического типирования штаммов возбудителя брюшного тифа методом фрагментного анализа (ОМ-Брюшной тиф-Генотип)» по ТУ 9398-019-46395995-2013.

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «ОМ-Брюшной тиф-Генотип» предназначен для генетического типирования бактериальных культур возбудителя брюшного тифа (*Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi*), выделенных в ходе микробиологических исследований клинического материала и проб из объектов внешней среды для выявления их индивидуальных генетических характеристик, обнаружения генетических связей между ними и с ранее идентифицированными штаммами тифозного микроба.

Диагностическая роль набора реагентов заключается в возможности его использования в поддержке постановки эпидемиологического диагноза при исследовании бактериальных культур *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi*, выделенных из материала от больного (подозрительного на заболевание); для определения генотипа брюшнотифозных изолятов из объектов окружающей среды; в качестве теста генетического типирования коллекционных штаммов *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi*.

1.3 Область применения набора

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика брюшного тифа, эпидемиологические расследования и мониторинг, идентификация патогенных биологических агентов, научные исследования. Набор может быть использован в учреждениях медицины и здравоохранения, в лабораториях Центров гигиены и эпидемиологии и противочумных учреждениях Роспотребнадзора, в эпидемиологических службах, а также в стационарных и мобильных лабораториях специализированных учреждений других министерств и ведомств, в том числе Министерства обороны.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «ОМ-Брюшной тиф-Генотип» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор реагентов состоит из 7 реагентов.

№	Состав набора	Описание	Объем/ кол-во	Кол-во
1.	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-БТ-Генотип1	сухое вещество розового цвета	1 мг	48 пробирок
2.	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-БТ-Генотип2	сухое вещество розового цвета	1 мг	48 пробирок
3.	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-БТ-Генотип3	сухое вещество розового цвета	1 мг	48 пробирок
4.	Разбавитель, РБ-Генотип	прозрачная бесцветная жидкость	1,0 мл	4 пробирки
5.	Положительный контрольный образец, ПКО-БТ-Генотип	сухое вещество белого цвета	2 мг	4 пробирки
6.	Раствор для разбавления ПКО-БТ-Генотип, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	1,5 мл	3 пробирки
7.	ТЕ-буфер, ТЕ	прозрачная бесцветная жидкость	15 мл	1 флакон

Реакционные смеси в стрипованных микропробирках (лиофилизированные), **РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3**, каждая расфасована в сорок восемь микропробирок (шесть стрипов) объемом 0,2 мл и упакована в непрозрачный полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 9×12 см. Все реакционные смеси в пакетах упакованы в один полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 15×20 см. Состав каждой реакционной смеси: эквимольная смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, четыре пары соответствующих флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, фермент Taq ДНК-полимераза, трегалоза.

Разбавитель, **РБ-Генотип**, расфасован в четыре пробирки из полипропилена объемом 1,5 мл с завинчивающимися крышками, упакованных в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 6×7 см, состав: ПЦР-буфер, хлорид магния, глицерол, вода для ПЦР.

Положительный контрольный образец (лиофилизированный), **ПКО-БТ-Генотип**, расфасован в четыре пробирки из полипропилена объемом 0,5 мл с завинчивающимися крышками, упакованных в полиэтиленовый пакет Zip-Lock

размером 4×7 см, состав: смесь 12-ти рекомбинантных плазмид pGem-T, каждая из которых содержит встроенную специфическую последовательность соответствующего полиморфного локуса генома *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi* с известным количеством нуклеотидных повторов: TR4699, TR4500, Sal23, STTR8, Sal20, STTR5, STTR7, TR3, Sal2, TR5, Sal6, TR1.

Раствор для разбавления ПКО-БТ-Генотип, **ОКО**, расфасован в три пробирки из полипропилена объемом 1,5 мл с завинчивающимися крышками, упакованные в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 6×7 см, состав: ТЕ-буфер.

ТЕ-буфер, **ТЕ**, расфасован во флакон из полипропилена объемом 15 мл с завинчивающейся крышкой, упакованный в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 6×10 см, состав: ТЕ-буфер.

Примечание: ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются флуоресцентно-меченые праймеры, основной характеристикой которых для конечного пользователя является температура отжига T_a , составляющая 60 °С. Данная характеристика реализуется с помощью температурно-временного режима амплификации, следовательно, его соблюдение является строго обязательным.

2.2 Количество анализируемых проб

Набор реагентов рассчитан на 48 определений, включая контрольные образцы.

2.3 Метод исследования

Генетическое типирование штаммов возбудителя брюшного тифа основано на использовании метода мультилокусного анализа переменных тандемных повторов (MLVA – от Multi Loci VNTR Analysis). Размер фрагментов определяется методом капиллярного гель-электрофореза с лазер-индуцированной флуоресцентной детекцией продуктов мультиплексной полимеразной цепной реакции с флуоресцентно-мечеными праймерами, специфичными в отношении 12-ти наиболее информативных VNTR-локусов генома *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi*, относительно размерного стандарта с известными длинами фрагментов ДНК.

VNTR-локусы – полиморфные участки генома микроорганизмов, которые содержат определенные повторяющиеся последовательности нуклеотидов, или так называемые вариабельные тандемные повторы (variable number tandem repeats, VNTR). Разные штаммы микроорганизмов внутри вида могут отличаться по количеству повторов в одном либо нескольких VNTR-локусах. При проведении генетического типирования анализируют несколько локусов генома, обладающих наибольшей вариабельностью количества нуклеотидных повторов у штаммов исследуемого вида микроорганизма.

Генетическое типирование методом фрагментного анализа осуществляется в два этапа.

На первом этапе проводят амплификацию 12-ти VNTR-локусов генома *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплификацию проводят в трех микропробирках, в каждой реакционной пробирке проходит одновременно четыре разных реакции (мультиплексная ПЦР), в ходе которых происходит синтез до 10^{10} копий каждого из анализируемых фрагментов ДНК. Праймеры в каждой мультиплексной ПЦР (один из каждой пары) химически связаны с четырьмя флуоресцентными красителями, детектируемыми в каналах FAM, R6G, TAMRA, ROX генетического анализатора. Таким образом, в ПЦР синтезируются флуоресцентно-меченые фрагменты ДНК. Постановка ПЦР осуществляется на приборах для ПЦР или ПЦР в реальном времени, например, GeneAmp 2700 (Thermo Scientific – Life Technologies, США), АНК-32 (32М, 48) (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия) или эквивалентных по характеристикам.

На втором этапе проводят фрагментный анализ продуктов ПЦР методом капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов с лазер-индуцированной флуоресцентной детекцией, например, «Устройство секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-04699534-2013, с принадлежностями» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия), ABI PRISM® 310/3100/3100Avant/3130/3130xl/3500/3500xl (Thermo Scientific – Life Technologies, США) или эквивалентных по характеристикам (см. п. 5.1 настоящей инструкции). Продукты амплификации разводят 1:10, затем 1 мкл

разведения добавляют к смеси, содержащей 10 мкл раствора деионизованного формамида (HI-DI™ Formamide, Thermo Scientific – Life Technologies, США) и 0,5 мкл раствора размерного стандарта ДНК, представляющего собой смесь фрагментов ДНК известной длины (GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard, Thermo Scientific – Life Technologies, США) (формамид и размерный стандарт в состав набора реагентов ОМ-Брюшной тиф-Генотип не входят). Полученные смеси денатурируют при 95 °С в течение 300 секунд и анализируют на генетических анализаторах «Устройство секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-04699534-2013, с принадлежностями» или ABI PRISM® 310/3100/3100Avant/3130/3130xl/3500/3500xl в капиллярах длиной 35 или 50 сантиметров, заполненных гелем на основе полидиметилакриламида, например, ПДМА-6 (ЗАО «Синтол», г. Москва, Россия) или POP-4/POP6/POP7 (Thermo Scientific – Life Technologies, США). Электрокинетическое нанесение продуктов амплификации и размерного стандарта в капилляры проводят при 1 кВ в течение 20 сек. Гель-электрофоретическое разделение проводят при 15 кВ и температуре капилляров 60 °С в течение 40 – 60 мин, в зависимости от длины капилляров и типа геля. Анализ длины продуктов амплификации осуществляют с использованием программы «Фрагментный анализ ДНК» для данных, полученных на приборе «Устройство секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-04699534-2013, с принадлежностями», и GeneMapper для приборов «Устройство секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-04699534-2013, с принадлежностями» и Thermo Scientific – Life Technologies, США. Значения длины продуктов амплификации приписываются программой прибора относительно размерного стандарта ДНК GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard*, включаемого в каждую пробирку капиллярного электрофореза.

*Размерный стандарт GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard является коммерческим продуктом. Информацию по метрологической прослеживаемости значений, приписанных данному стандарту, в том числе по применимым референтным материалам и/или референтным процедурам измерений более высокого порядка, можно получить у официальных представителей производителя (Thermo Scientific – Life Technologies, USA) в РФ.

Результатом анализа является индивидуальный генетический профиль исследуемой бактериальной культуры (штамма) *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi*, представляющий собой совокупность размеров 12-ти VNTR-локусов с известным количеством tandemных повторов в каждом локусе.

2.4 Ограничения метода

Набор реагентов «ОМ-Брюшной тиф-Генотип» обеспечивает внутривидовую дифференциацию штаммов возбудителя брюшного тифа при содержании ДНК микроорганизма в исследуемом образце в концентрации от 0,01 до 1,0 нг·мкл⁻¹.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1.1 Аналитическая специфичность

Специфичность видовая – ложноположительные и ложноотрицательные результаты при анализе образцов ДНК *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi* (3 заведомо положительных образца), а также ДНК гетерологичных видов *Salmonella gallinarum* 24 KCT, *Salmonella gallinarum* 572, *Salmonella gallinarum* 665, *Salmonella enteritidis* 204, *Salmonella enteritidis* 232, *Salmonella enteritidis* 11272, *Salmonella paratyphi* A225, *Salmonella virchow* O6, *Salmonella virchow* БО 25-3, *Salmonella virchow* МО 26-7, *Salmonella infantis* КО 38-2 (11 заведомо отрицательных образцов) отсутствовали.

Специфичность штаммовая (внутривидовая дифференциация штаммов возбудителя брюшного тифа) – при анализе образцов ДНК, выделенных из 21 штамма *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi* различного происхождения, каждый из которых заведомо имеет уникальный генетический профиль по 12-ти VNTR-локусам, ложные причисления отсутствовали. В каждом случае был выявлен генетический профиль, соответствующий конкретному штамму тифозного микроба.

3.1.2 Воспроизводимость

Воспроизводимость – при исследовании ДНК штамма 4446 *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi* в 30 повторах получено полное совпадение результатов по каждому локусу, следовательно, согласно таблицам Генеса, воспроизводимость анализа составляет 97 %.

3.2 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.2.1 Вероятность ложных причислений

Вероятность ложных причислений – при анализе образцов ДНК 28 штаммов *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi*, выделенных из различных источников и имеющих различный генетический профиль, подтвержденный для каждого образца результатами секвенирования всех 12 VNTR-локусов, ложных причислений выявлено не было. В каждом случае был получен индивидуальный генетический профиль с количеством tandemных повторов для каждого локуса полностью совпадающий с установленным путем секвенирования. Вероятность ложных причислений – не более 2 % с доверительной вероятностью 90 %.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работу проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», СП 3.1.1.2137-06 «Профилактика брюшного тифа и паратифов», методических рекомендаций «Бактериологическая диагностика брюшного тифа и паратифов А, В и С» (утв. Роспотребнадзором 29.12.2007 МУ 0100/13745-07-34).

Подготовку микропробирок для спектральной калибровки генетического анализатора, а также плашки с образцами для анализа на генетическом анализаторе проводят под вытяжкой для улавливания паров формамида.

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (п. 9 приложения № 2 к приказу Минздрава России от 06.06.2012 № 4н).

4.1 Необходимость обучения персонала

Для выполнения анализа с помощью данного набора реагентов необходимо участие специалиста с высшим медицинским образованием, прошедшего обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА III-IV групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также лаборанта со средним специальным медицинским образованием. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

4.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

4.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

4.4 Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку в состав изделия не входят вещества человеческого или животного происхождения с учетом их потенциальной инфекционной природы.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Генетический анализатор на основе метода капиллярного гелелектрофореза с детекцией флуоресценции индуцируемой лазером и имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM, R6G, TAMRA, ROX, LIZ (либо их спектральным аналогам) со следующими характеристиками – $\lambda_{\text{макс.возб.}}/\lambda_{\text{макс.эм.}}$ (№1 – 490нм/520нм, №2 – 525нм/550нм, №3 – 550нм/580нм, №4 – 580нм/610нм, №5 – 630нм/665нм), например, «Устройство секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-04699534-2013, с принадлежностями», «Анализатор генетический Applied Biosystems 3500 Dx, с принадлежностями».

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в настольных боксах с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленных в рабочей зоне 3 для проведения ПЦР и 4-1 для проведения непосредственно генетического анализа (МУ 1.3.2569-09).

5.3 Дозирующие устройства

Набор автоматических пипеток переменного объема на 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл и на 20-200 мкл;

штатив-карусель для данных пипеток.

5.4 Другое используемое оборудование

Микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901»);

микроцентрифуга для стрипованных микропробирок объемом 0,2 мл (например, «Циклотемп-903»);

прибор для ПЦР или ПЦР-РВ с блоком под пробирки 0,2 мкл (например, GeneAmp 2700, «АНК-32 (32М, 48)»);

приспособление для прижатия крышек микропробирок «Амплипресс» (кат. номер СТ-14, ЗАО «Синтол»);

спектрофотометр (например, NanoDrop 8000 «Scientific»);

холодильник на 2 – 8°C с морозильной камерой на минус 20°C;

штативы для наконечников, микропробирок объемом 0,5 и 1,5 мл;

штатив для работы со стрипованными микропробирками объемом 0,2 мл (кат. номер СТ-15, ЗАО «Синтол»).

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

Гель ПДМА-6 (кат. номер ПДМА-6, ЗАО «Синтол»);

деионизованный формамид HI-DI™ Formamide (кат. номер 4311320 Thermo Scientific – Life Technologies);

размерный стандарт GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard (кат. номер 4379950 Thermo Scientific – Life Technologies);

комплект средств для обработки рабочего места;

набор реагентов для выделения ДНК;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 20 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

резиновый антииспаритель для 96-луночного планшета (96-Well Plate Septa 4315933, ООО «Компания Хеликон»);

спектральный калибратор СК-5-ЕТ (кат. номер СК-5-ЕТ, ЗАО «Синтол»);

ТЕ-буфер (кат. номер В-014, ЗАО «Синтол»);

96-ти луночные плашки для ПЦР (кат. номер SSI-3400, ООО «Компания Хеликон»).

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Выделение ДНК из микробных культур возбудителя брюшного тифа не является частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «ОМ-Брюшной тиф-Генотип».

6.1 Тип исследуемых образцов

Исследованию подлежат препараты нуклеиновых кислот микробных культур *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi*, выделенные и идентифицированные как *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi*, в соответствии с СП 3.1.1.2137-06 «Профилактика брюшного тифа и паратифов» и МУ 0100/13745-07-34 «Бактериологическая диагностика брюшного тифа и паратифов А, В и С».

6.2 Процедура получения и предварительной подготовки биологического материала и проб из объектов окружающей среды

Все работы с микробными культурами возбудителя брюшного тифа осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08. «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-

IV групп патогенности», СП 3.1.1.2137-06 «Профилактика брюшного тифа и паратифов», методических рекомендаций «Бактериологическая диагностика брюшного тифа и паратифов А, В и С» (МУ 0100/13745-07-34).

6.3 Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование микробных культур возбудителя брюшного тифа, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасной работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) (СП 1.3.2322-08) и действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

6.4 Обеззараживание проб

Обеззараживание образцов микробных культур проводят в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». Исследуемую микробную культуру *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi* с использованием стандартов мутности разводят до оптической концентрации $10^7 - 10^8$ м.к.·мл⁻¹. К исследуемым образцам добавляют натрия мертиолят до концентрации 1:10000 (0,01 %) с последующим прогреванием их при 56 °С в течение 30 мин. Затем к 100 мкл образцов, обработанных мертиолятом натрия и разлитых в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляют лизирующий буфер на основе 6 моль гуанидинизотиоцианата в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК и инкубируют 15 мин при температуре 65 °С.

Обработанные таким образом пробы считают обеззараженными и всю последующую работу проводят как с незаразным материалом.

6.5 Выделение ДНК

Для выделения ДНК используют зарегистрированные наборы реагентов. Полученный препарат ДНК используется для проведения анализа с помощью набора реагентов «ОМ-Брюшной тиф-Генотип».

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Процедура приготовления контрольного образца

В пробирку с сухим содержимым **ПКО-БТ-Генотип** добавляют 200 мкл **ОКО**, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при $3000 \text{ об.} \cdot \text{мин}^{-1}$. Хранение разведенных препаратов **ПКО-БТ-Генотип** допускается при температуре не выше минус 20 °С не более месяца.

7.2 Разведение препарата ДНК

Для амплификации полиморфных локусов генома *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi* в каждую реакцию смесь (**РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3**) вносят по 5 мкл препарата ДНК, при этом количество ДНК в пробе, вносимой в реакцию смесь, должно составлять от 0,05 до 5,0 нг.

Концентрацию ДНК в каждом препарате измеряют спектрофотометрически и в случае необходимости разводят с помощью ТЕ-буфера до $0,01 - 1,0 \text{ нг} \cdot \text{мкл}^{-1}$.

7.3. Проведение ПЦР

Расход каждого реагента

Для исследования методом фрагментного анализа продуктов амплификации VNTR-локусов одного штамма (изолята) *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi* из состава Набора реагентов «ОМ-Брюшной тиф-Генотип» требуется:

для **ОКО** – 3 микропробирки, по одной с каждой реакционной смесью (**РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3**);

для **ПКО-БТ-Генотип** – 3 микропробирки, по одной с каждой реакционной смесью (**РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3**);

для **исследуемого образца** – 3 микропробирки, по одной с каждой реакционной смесью (**РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3**).

Соответственно для исследования **N** изолятов (штаммов) возбудителя брюшного тифа требуется **N+2** пробирок с каждой реакционной смесью (**РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3**), где **N** – количество исследуемых

микробных культур *Salmonella enterica* подвида *enterica* серотип *typhi*, 2 – количество контролей (**ПКО-БТ-Генотип** и **ОКО**).

На каждый анализ расходуется:

- 15 мкл **ПКО-БТ-Генотип**;
- 15 мкл **ОКО**.

7.3.1 Последовательность проведения этапов анализа

Анализ с помощью набора реагентов проводится в два этапа:

- проведение ПЦР;
- проведение фрагментного анализа.

7.3.1.1 Проведение ПЦР

- включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации;
- вводят согласно таблице 1 в диалоговый интерфейс программы амплификатора параметры температурно-временного режима;

Таблица 1 – Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95 °С – 300 секунд	1
2	60 °С – 40 секунд	35
3	95 °С – 15 секунд	

- набор реагентов извлекают из холодильника, **РБ-Генотип** и **ПКО-БТ-Генотип** перемешивают на вортексе и центрифугируют в течение 5 секунд при 3000 об.·мин⁻¹;

- отбирают необходимое количество микропробирок с реакционными смесями **РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3** равное количеству образцов плюс две для контролей (**ПКО-БТ-Генотип** и **ОКО**) (при необходимости разрезают стрипованные микропробирки) и устанавливают в штатив (например, СТ-15, ЗАО «Синтол»);

- открывают крышки микропробирок с реакционными смесями **РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3** и вносят в них по 20 мкл **РБ-Генотип**;

- используя наконечники с аэрозольным барьером, последовательно вносят в микропробирки **РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3** по 5 мкл **ОКО**, а затем по 5 мкл растворов **исследуемых образцов**, закрывают крышки микропробирок;

- вносят в микропробирки в соответствии с маркировкой по 5 мкл **ПКО-БТ-Генотип**, закрывают крышки микропробирок;

- перемешивают содержимое микропробирок на вортексе и центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Помещают микропробирки в прибор для ПЦР (ПЦР-РВ) и прижимают крышки микропробирок (например, с помощью приспособления «Амплипресс» СТ-14, ЗАО «Синтол»).

- закрывают крышку прибора, запускают реакцию ПЦР и фиксируют в рабочем журнале название файла (время реакции составляет около 1 часа).

7.3.1.2 Проведение фрагментного анализа

7.3.1.2.1 Спектральная калибровка генетического анализатора

Для корректного анализа флуоресцентно-меченых продуктов амплификации VNTR-локусов генома *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi* проводят спектральную калибровку генетического анализатора «Устройство секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-04699534-2013, с принадлежностями» или ABI PRISM® 310/3100/3100Avant/3130/3130xl/3500/3500xl с помощью спектрального калибратора СК-5-ЕТ (ЗАО «Синтол», Россия) (не входит в состав набора «ОМ-Брюшной тиф-Генотип»):

- для приготовления рабочего раствора спектрального калибратора СК-5-ЕТ добавляют 15 мкл деионизованной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный СК-5-ЕТ (пробирка с бесцветной крышкой) и инкубируют при комнатной температуре в течение 2 мин, после чего тщательно перемешивают раствор на вортексе и осаждают на дне пробирки центрифугированием (допускается хранение раствора в темном месте при температуре минус 20 °С в течение года);

- для калибровки 8-ми капиллярного генетического анализатора отбирают 5 мкл раствора и смешивают с 80 мкл деионизованного формамида, после чего тщательно перемешивают раствор на вортексе и осаждают центрифугированием;

- отбирают по 10 мкл полученного раствора в 8 пробирок по 200 мкл (одиночных, в составе стрипа или лунки А – Н 96-луночного планшета) и помещают микропробирки в держатель планшета, закрывают резиновым антииспарителем, закрепляют фиксатором и ставят в прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации;

- спектральную калибровку генетического анализатора проводят по стандартному протоколу в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

7.3.1.2.2 Подготовка плашки с образцами для анализа на генетическом анализаторе

Готовят смесь деионизованного формамида и размерного стандарта GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard, смешивая $50 \times (N+2)$ мкл деионизованного формамида и $1,5 \times (N+2)$ мкл размерного стандарта, где N – количество исследуемых образцов, 2 – количество контролей. Полученную смесь перемешивают, центрифугируют и раскапывают по 10 мкл в микропробирки стандартных стрипов (например, SSI-3111) или 96-ти луночных плашек для ПЦР (например, SSI-3400).

Готовят аликвоты 1:10 растворов ампликонов. Для этого готовят N пробирок с 45 мкл ТЕ-буфера (ТЕ из состава набора) в каждой и вносят по 5 мкл ампликонов индивидуальным наконечником с аэрозольным барьером. Полученную смесь перемешивают, центрифугируют и переносят по 1 мкл разведенных в 10 раз продуктов амплификации в микропробирки со смесью деионизованного формамида и размерного стандарта, перемешивают, центрифугируют и денатурируют при 95 °C в течение 300 с.

Помещают микропробирки в держатель планшета, закрывают резиновым антииспарителем, закрепляют фиксатором и ставят в прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации.

7.3.1.2.3 Проведение капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе

- запускают программу управления генетическим анализатором (для «Устройства секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-04699534-2013, с принадлежностями» SeqPI.exe, для «Анализатор генетический Applied Biosystems 3500 Dx, с принадлежностями» Data Collection);

- выбирают программу фрагментного анализа (в зависимости от длины установленных на приборе капилляров, например, для «Устройство секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-04699534-2013, с принадлежностями» с линейкой капилляров длиной 35 см программу «VNTR Salmonella typhi 35см.avt», для ABI PRISM® 310/3100/3100Avant/3130/3130xl/3500/3500xl/ Fragment Analysis_X_POP_Y, где X – длина капилляров, Y – тип полимера = 4, 6 или 7);

- проводят описание плашки по рядам с образцами, вводя следующие обязательные сведения:

названия образцов;

тип образца (образец, положительный контроль, отрицательный контроль);

используемый набор красителей (СК-5-ЕТ);

метод анализа (для генетического анализатора «Устройство секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-04699534-2013, с принадлежностями» в соответствии с таблицей 2, для генетических анализаторов ABI PRISM® 310/3100/3100Avant/3130/3130xl/3500/3500xl Sizing Default);

используемый размерный стандарт (LIZ 600);

- запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

Таблица 2 – Выбор метода анализа в зависимости от реакционной смеси

Метод анализа	Реакционная смесь
СТ-1	РС-БТ-Генотип1
СТ-2	РС-БТ-Генотип2
СТ-3	РС-БТ-Генотип3

7.4 Процедура измерения результатов анализа

Оценку результатов проводят с помощью программного обеспечения к генетическому анализатору.

7.5 Учет результатов реакции

7.5.1 Результаты анализа не подлежат учету:

- в случае регистрации продуктов амплификации в любой из пробирок (РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3) с ОКО по любому из каналов FAM, ROX, R6G, TAMRA**;

- в случае одновременной регистрации двух и более продуктов амплификации (отличающихся по размерам и количеству повторов от представленных в таблице 3) в любой из пробирок (РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3) с ПКО-БТ-Генотип по любому из каналов FAM, ROX, R6G, TAMRA**;

- в случае отсутствия регистрации продуктов амплификации в любой из пробирок (РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3) с ПКО-БТ-Генотип по любому из каналов FAM, ROX, R6G, TAMRA***;

** Требуется повторить исследование с этапа постановки ПЦР (п.п. 7.3.1.1 настоящей инструкции). Повторное присутствие флуоресцентно-меченых продуктов амплификации в любой из пробирок с ОКО, детектируемых по любому из каналов FAM, ROX, R6G, TAMRA, также как и повторная регистрация дополнительных продуктов амплификации по любому из каналов в пробирках с ПКО-БТ-Генотип свидетельствуют о контаминации лаборатории специфическими последовательностями генома *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi* (продуктами амплификации полиморфных локусов). Рекомендуется провести работы, направленные на устранение контаминации в лаборатории, заменить набор реагентов и повторить исследование;

*** Отсутствие флуоресцентно-меченых продуктов амплификации в любой из пробирок с ПКО-БТ-Генотип требует повторного исследования с этапа постановки ПЦР (п.п. 7.3.1.1 настоящей инструкции). В случае повторного отрицательного результата необходимо заменить набор реагентов и повторить исследование;

- в случае одновременной регистрации двух и более продуктов амплификации по любому из каналов **FAM, ROX, R6G, TAMRA** в любой из пробирок (**РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3**) с исследуемым образцом (образцами)****.

7.5.2 Результаты анализа подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации продуктов амплификации во всех пробирках (**РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3**) с **ОКО** по каналам **FAM, ROX, R6G, TAMRA**;

- в случае регистрации продуктов амплификации ожидаемых размеров (таблица 3) во всех пробирках (**РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3**) с **ПКО-БТ-Генотип** по каналам **FAM, ROX, R6G, TAMRA**;

- в случае регистрации продуктов амплификации ожидаемых размеров (таблица 3) во всех пробирках (**РС-БТ-Генотип1 – РС-БТ-Генотип3**) с **исследуемым образцом (образцами)** по каналам **FAM, ROX, R6G, TAMRA*******.

**** Одновременная регистрация двух и более продуктов амплификации в пробирках с исследуемым образцом (образцами), детектируемых по любому из каналов **FAM, ROX, R6G, TAMRA** (при отсутствии продуктов амплификации в пробирках с **ОКО** и наличии соответствующих продуктов амплификации в пробирках с **ПКО-БТ-Генотип**), требует повторного проведения анализа начиная с этапа выделения ДНК с целью исключения возможной контаминации в ходе пробоподготовки образцов. В случае повторного совпадения результатов исследования необходимо проведение клонового анализа данной бактериальной культуры *Salmonella enterica* подвида *enterica* серотип *typhi* на предмет выявления присутствия в ней нескольких штаммов брюшнотифозного микроба.

***** В случае несовпадения размеров отдельных продуктов амплификации в пробирках с исследуемым образцом (образцами) с заложенными в шаблоне, необходимо повторное проведение анализа начиная с этапа выделения ДНК. В случае повторного выявления продуктов амплификации, несовпадающих по размеру необходимо провести их секвенирование для выявления нуклеотидных последовательностей данных локусов и количества VNTR-повторов в них.

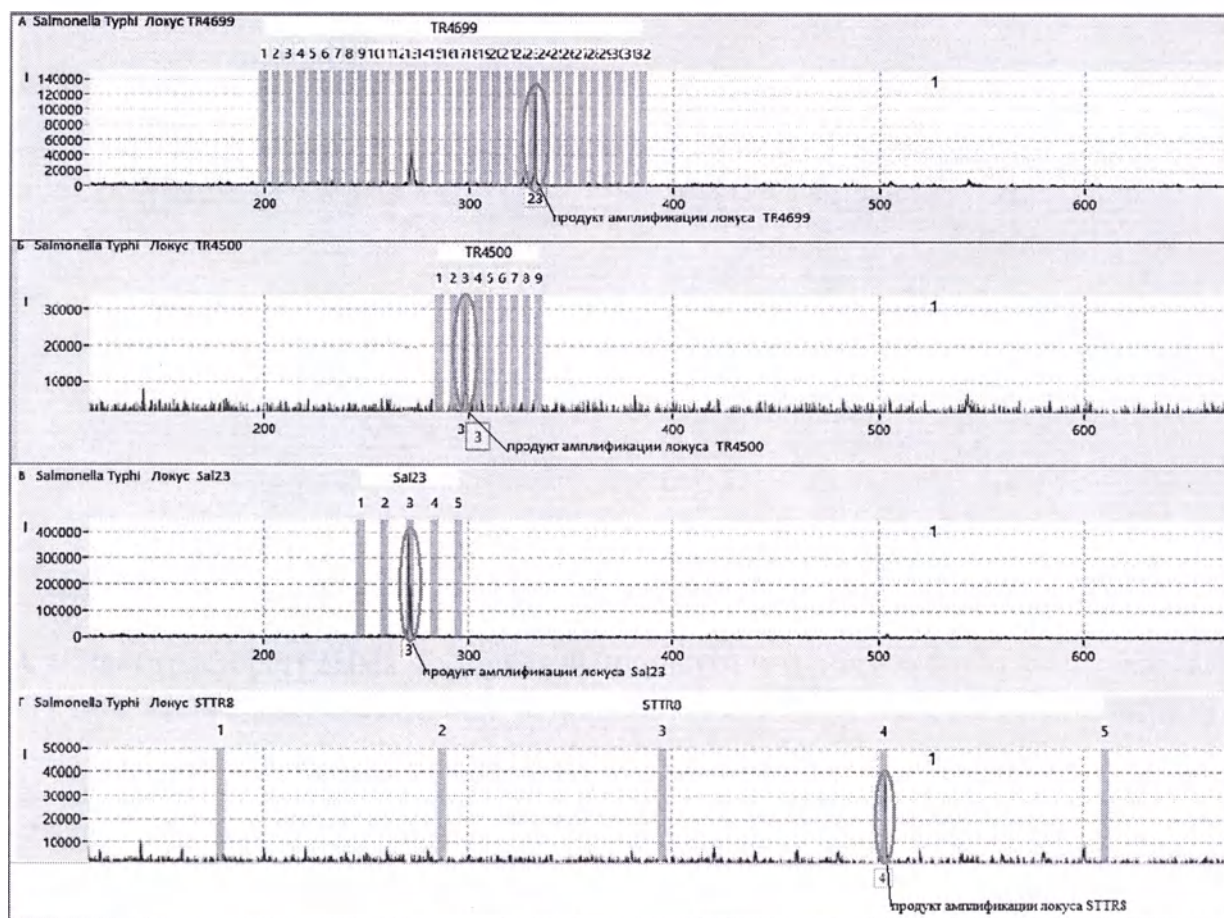
В случае получения неполного генетического профиля, необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК. При повторном получении неполного генетического профиля необходимо проведение секвенирования полного генома микроорганизма с целью выявления возможных изменений последовательности ДНК в тех VNTR-локусах, для которых не были получены продукты амплификации.

Таблица 3 – Диапазоны размеров продуктов амплификации и длины повторов известных аллелей 12-ти VNTR-локусов *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi*, выявляемых с использованием набора реагентов «ОМ-Брюшной тиф-Генотип»

Реакционная смесь	Наименование VNTR-локуса	Канал детекции	Диапазон длин продуктов амплификации, нуклеотид	Длина (шаг) повтора, нуклеотид	Размер продукта амплификации ПКО-БТ-Генотип, нуклеотид*	Количество повторов ПКО-БТ-Генотип, шт.
РС-БТ-Генотип1	TR4699	FAM	199-388	6	332	23
	TR4500	R6G	284-304	6	298	3
	Sal23	TAMRA	247-271	12	271	3
	STTR8	ROX	179-504	108	504	4
РС-БТ-Генотип2	Sal20	FAM	147-201	3	195	17
	STTR5	R6G	178-292	6	268	16
	STTR7	TAMRA	347-581	39	581	7
	TR3	ROX	562-586	26	586	2
РС-БТ-Генотип3	Sal2	FAM	107-239	6	190	15
	TR5	R6G	175-196	7	188	3
	Sal6	TAMRA	168-204	6	198	6
	TR1	ROX	198-289	7	268	11
Примечание * – значения размеров продуктов амплификации VNTR-локусов получены путем расчета с использованием программного обеспечения к генетическому анализатору «Устройство секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-04699534-2013, с принадлежностями» «Фрагментный анализ ДНК», относительно размерного стандарта GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard						

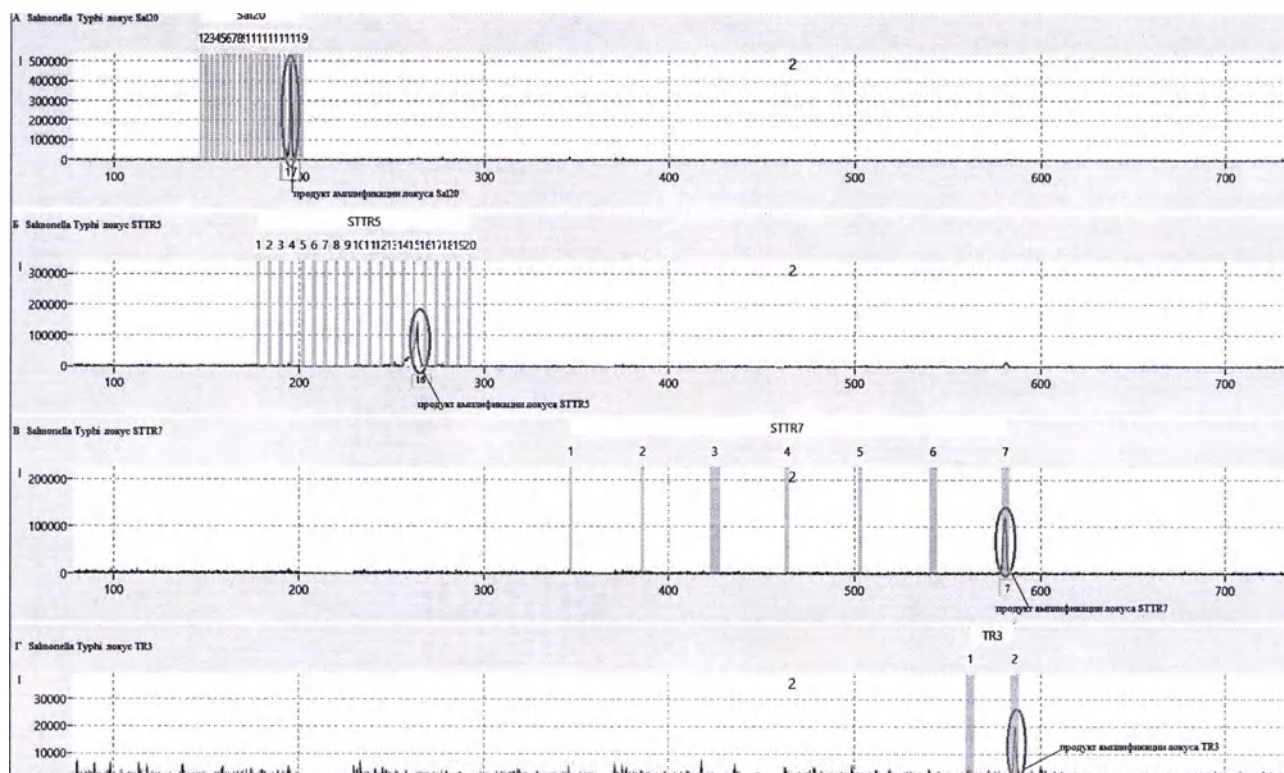
На рисунках 1-3 представлены результаты автоматизированного гелелектрофоретического разделения с лазер-индуцируемой детекцией продуктов амплификации положительного контрольного образца ДНК ПКО-БТ-Генотип, полученные с использованием генетического анализатора «Устройство секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-04699534-2013, с принадлежностями» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия). По оси ординат на каждой электрофореграмме отмечены относительные единицы флуоресценции, по оси абсцисс отмечена рассчитываемая по размерному стандарту GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard длина фрагментов ДНК в нуклеотидах. Серые вертикальные столбцы (так называемые бины), соответствуют известным аллелям полиморфных локусов ДНК *S. enterica* подвид *enterica* серотип *typhi* и обеспечивают их программную визуализацию. Над каждой группой бинов находится название соответствующего

локуса. При наложении экспериментально полученного сигнала флуоресценции (пика) на соответствующий бин ему автоматически присваивается числовое значение соответствующего количества tandemных повторов.



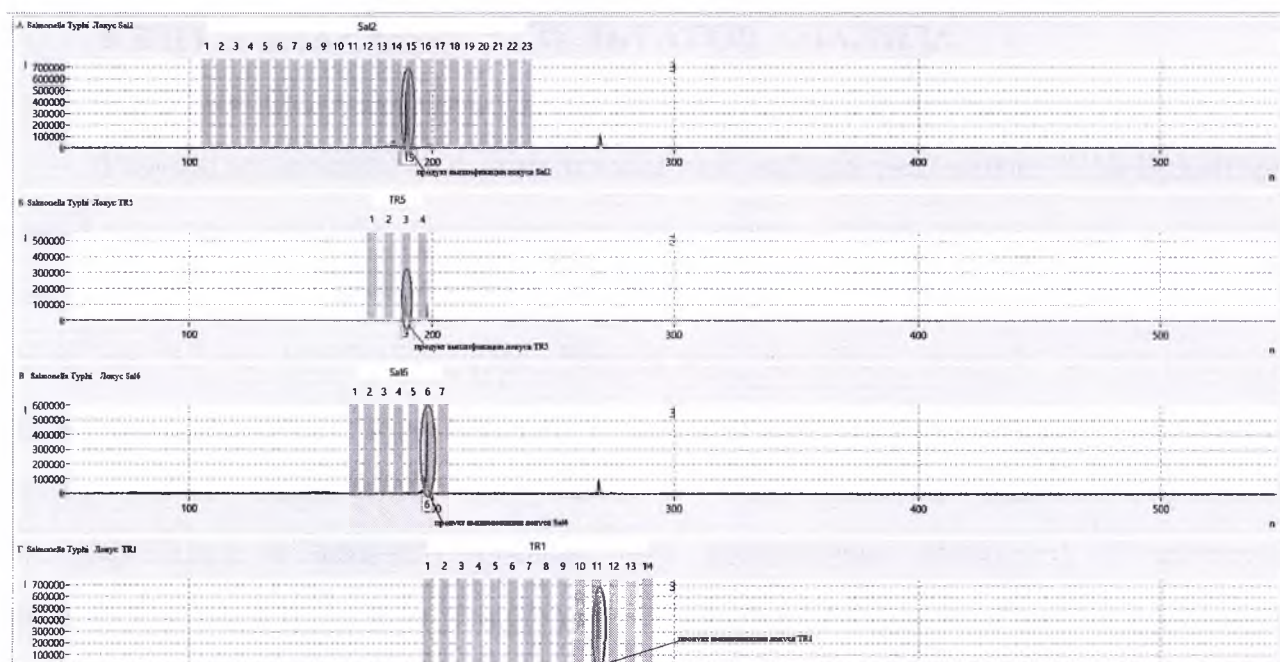
- А** – Электрофореграмма продукта амплификации локуса TR4699, содержащего 23 повторов (цифрами от 1 до 32 обозначены известные повторы в данном локусе);
- Б** – Электрофореграмма продукта амплификации локуса TR4500, содержащего 3 повтора (цифрами от 1 до 9 обозначены известные повторы в данном локусе);
- В** – Электрофореграмма продукта амплификации локуса Sal23, содержащего 3 повтора (цифрами от 1 до 5 обозначены известные повторы в данном локусе);
- Г** – Электрофореграмма продукта амплификации локуса STTR8, содержащего 4 повтора (цифрами от 1 до 5 обозначены известные повторы в данном локусе)

Рисунок 1 – Результаты автоматизированного гель-электрофоретического разделения с лазер-индуцируемой детекцией флуоресцентно-меченых продуктов амплификации положительного контрольного образца ДНК **ПКО-БТ-Генотип** для реакционной смеси **РС-БТ-Генотип1**



- А – Электрофореграмма продукта амплификации локуса Sal20, содержащего 17 повторов (цифрами от 1 до 19 обозначены известные повторы в данном локусе);
- Б – Электрофореграмма продукта амплификации локуса STTR5, содержащего 16 повторов (цифрами от 1 до 20 обозначены известные повторы в данном локусе);
- В – Электрофореграмма продукта амплификации локуса STTR7, содержащего 7 повторов (цифрами от 1 до 7 обозначены известные повторы в данном локусе);
- Г – Электрофореграмма продукта амплификации локуса TR3, содержащего 2 повтора (цифрами от 1 до 2 обозначены известные повторы в данном локусе)

Рисунок 2 – Результаты автоматизированного гель-электрофоретического разделения с лазер-индуцируемой детекцией флуоресцентно-меченых продуктов амплификации положительного контрольного образца ДНК **ПКО-БТ-Генотип** для реакционной смеси **РС-БТ-Генотип2**



- А** – Электрофореграмма продукта амплификации локуса Sal2, содержащего 15 повторов (цифрами от 1 до 23 обозначены известные повторы в данном локусе);
- Б** – Электрофореграмма продукта амплификации локуса TR5, содержащего 3 повтора (цифрами от 1 до 4 обозначены известные повторы в данном локусе);
- В** – Электрофореграмма продукта амплификации локуса Sal6, содержащего 6 повторов (цифрами от 1 до 7 обозначены известные повторы в данном локусе);
- Г** – Электрофореграмма продукта амплификации локуса TR1, содержащего 11 повторов (цифрами от 1 до 14 обозначены известные повторы в данном локусе)

Рисунок 3 – Результаты автоматизированного гель-электрофоретического разделения с лазер-индуцируемой детекцией флуоресцентно-меченых продуктов амплификации положительного контрольного образца ДНК **ПКО-БТ-Генотип** для реакционной смеси **РС-БТ-Генотип3**

8 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

8.1 Получение индивидуального генетического профиля

Результатом анализа с использованием набора реагентов «ОМ-Брюшной тиф-Генотип» является индивидуальный генетический профиль исследуемой бактериальной культуры (штамма) *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi* по 12-ти VNTR-локусам. Результаты анализа каждой бактериальной культуры (штамма) оформляют в виде таблицы, в которой указывают генетические характеристики каждого VNTR-локуса (размер продукта амплификации и соответствующее ему количество повторов). В качестве примера в таблице 4 представлены результаты генетического типирования с использованием набора реагентов «ОМ-Брюшной тиф-Генотип» штамма 4446 *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi*.

Таблица 4 – Генетический профиль штамма 4446 *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi*

№ п/п	Наименование VNTR-локуса	Длина (шаг) повтора, нуклеотид	Размер продукта амплификации, нуклеотид	Количество повторов, шт.
1.	TR4699	6	332	23
2.	TR4500	6	298	3
3.	Sal23	12	271	3
4.	STTR8	108	504	4
5.	Sal20	3	195	17
6.	STTR5	6	268	16
7.	STTR7	39	581	7
8.	TR3	26	586	2
9.	Sal2	6	190	15
10.	TR5	7	188	3
11.	Sal6	6	198	6
12.	TR1	7	268	11

8.2 Анализ генетического профиля

Индивидуальный генетический профиль исследуемой культуры (штамма) возбудителя брюшного тифа рассчитывается автоматически с помощью программного обеспечения «Фрагментный анализ ДНК», поставляемого с генетическим анализатором «Устройство секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-

04699534-2013, с принадлежностями». Анализ и сравнение полученного генетического профиля проводится с помощью шаблона, в который занесены результаты предыдущих исследований. Шаблон поставляется с пакетом программного обеспечения при поставке генетического анализатора «Устройство секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-04699534-2013, с принадлежностями», либо по запросу.

Если выявленные размеры продуктов амплификации полиморфных локусов отличаются от заложенных в программном продукте «Фрагментный анализ ДНК», необходимо повторить выделение ДНК из исследуемой бактериальной культуры (штамма) *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi* и повторно с использованием набора реагентов «ОМ-Брюшной тиф-Генотип» провести анализ генетического профиля по всем 12-ти VNTR-локусам. В случае совпадения результатов анализа необходимо провести секвенирование отличающихся по размеру продуктов амплификации соответствующих VNTR-локусов.

При получении неполного генетического профиля, также необходимо повторить выделение ДНК из исследуемой бактериальной культуры (штамма) *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi* и повторно с использованием набора реагентов «ОМ-Брюшной тиф-Генотип» провести анализ генетического профиля по всем 12-ти VNTR-локусам. В случае повторения результатов анализа, достоверно установить генетический профиль исследуемой культуры (штамма) невозможно.

Выявленные с использованием набора реагентов «ОМ-Брюшной тиф-Генотип» генетические профили бактериальных культур *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *typhi*, выделенных в ходе микробиологических исследований различных проб в эпидемических очагах являются объективной доказательной базой для установления причинно-следственных связей возникновения вспышки брюшного тифа.

9 РАСЧЕТЫ

9.1 Используемые компьютерные программы

Для оценки результатов фрагментного анализа используют специализированное программное обеспечение "Фрагментный анализ ДНК" версия 5.0 и выше, поставляемое производителем прибора «Устройство секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-04699534-2013, с принадлежностями». Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора «Устройство секвенирования ДНК по ТУ 9443-005-04699534-2013, с принадлежностями» и руководству оператора программы анализа данных "Фрагментный анализ ДНК" (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия).

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Условия хранения набора

В соответствии с ТУ 9398-019-46395995-2013 – в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Суммарный срок хранения при температуре от плюс 9 до плюс 20 °С не должен превышать 14 суток в течение срока годности набора реагентов.

10.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «ОМ-Брюшной тиф-Генотип» должно производиться в соответствии с ТУ 9398-019-46395995-2013 крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Допускается транспортирование до 14 суток при температуре до плюс 20 °С.

10.3 Срок годности набора

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное. Срок годности разведенных

препаратов **ПКО-БТ-Генотип** не более месяца при температуре хранения не выше минус 20 °С.

10.4 Информация по безопасной утилизации

Использование набора происходит в рабочей зоне 3, не подразумевающей контакта с биоматериалом (МУ 1.3.2569-09). Использованные наборы после анализа препаратов РНК собирают в пластиковые закрывающиеся емкости и выносят в рабочую зону 4-1 либо специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей утилизации по классу Б (СанПиН 2.1.7.2790-10).

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

10.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «ОМ-Брюшной тиф-Генотип» направлять на предприятие-изготовитель ЗАО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42, тел. (495) 984-69-93, факс. (499) 977-74-55 E.mail: syntol@syntol.ru).

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 набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ЗАО «Синтол» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.

Прошито, пронумеровано,
проброшюровано 28 листов

Генеральный директор
ЗАО «Синтол»

А.В. Кузубов

