

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения
генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина,
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления
«РеалБест-Генетика Варфарин (GGCX)»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «РеалБест-Генетика Варфарин (GGCX)» предназначен для определения однонуклеотидного полиморфизма rs11676382 C/G гена *GGCX*, влияющего на подбор индивидуальной дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой с последующим анализом кривых плавления.

Выделение ДНК из клинического материала (бuccального эпителия, цельной крови) осуществляется с помощью наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для применения с регистрирующим амплификатором «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ Т.И. Д.И. нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота).

Наиболее важным для подбора индивидуальной дозы варфарина является определение полиморфизмов 430 C/T гена *CYP2C9* (Arg144Cys, аллель *CYP2C9*2*), 1075 A/C гена *CYP2C9* (Ile359Leu, аллель *CYP2C9*3*), 1080 C/G гена *CYP2C9* (Asp360Glu, аллель *CYP2C9*5*), 818 delA гена *CYP2C9* (273 Frame shift, аллель *CYP2C9*6*), 1297 C/T гена *CYP4F2* (Val433Met, аллель *CYP4F2*3*), rs11676382 C/G гена *GGCX* и гаплотипа *VKORC1*.

Полученный результат молекулярно-генетического анализа может быть использован лечащим врачом для подбора индивидуальной дозы варфарина с учётом выявленных генетических особенностей при помощи международного ресурса www.WarfarinDosing.org.

2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

- контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) – 1 пробирка, 1 мл;
- контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) – 1 пробирка, 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок;
- элюирующий раствор «Генетика» – 2 фл. по 12 мл.

Принадлежности:

- оптическая плёнка – 1 лист.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения однонуклеотидного полиморфизма rs11676382 C/G гена *GGCX* определяется по стандартному образцу предприятия, СОП (рег. № 05-2-647).

Специфичность составляет 100 % при условии, что генотип по полиморфизму rs11676382 C/G гена *GGCX* в образцах №1 и №2 определяется в соответствии с инструкцией к СОП.

3.2. Для КО1 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления

по каналу «FAM» (56 ± 3)°C.

3.3. Для КО2 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления по каналу «FAM» (40 ± 3)°C.

3.4. Диагностическая специфичность определения полиморфизма rs11676382 C/G гена *GGCX*: клинические испытания, проведенные на 216 образцах, показали 100% специфичность (интервал 98,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

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

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания

по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:
«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США);
- ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», АО «Ламинарные системы, Россия»);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- мини-шейкер PSU-2T (фирма «BioSan», Латвия);
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма «Eppendorf», Германия);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма «Biohit», Финляндия);
- встряхиватель для пробирок (Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTip», Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 – 2 мл и 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);
- магнитный штатив для пробирок (фирма АО «Вектор-Бест», Россия);
- нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа подготовить клинические образцы (буккального эпителия, цельной крови) с помощью наборов для выделения ДНК «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содер-

жать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

Выделение ДНК из образцов проводить без добавления внутреннего контрольного образца (ВКО). КО1 и КО2 проходят процедуру выделения ДНК аналогично положительному контрольному образцу (ПКО) (см. инструкцию набора для выделения).

Элюцию образцов проводить в 200 мкл элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить 400 мкл элюирующего раствора «Генетика», входящего в состав данного набора. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту. Установить пробирки в магнитный штатив.

6.1.2. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов проводить согласно инструкции набора. Пробы готовы к постановке ПЦР-анализа.

6.1.3. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 КО1 и 1 КО2) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в целфеновый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2-8) °С составляет 3 месяца.

КО1 и КО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК человека и регистрации кривых плавления.

Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору и пп. 7.6.-7.9.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации и детекции кривых плавления:

- 1 стадия: 50 °C – 2 минуты;
- 2 стадия: 95 °C – 2 минуты;
- 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд);
- 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °C до 75 °C с шагом 1 °C в течение 5 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);
- 5 стадия: 10 °C – 1 минута.

7.7. Выбрать канал «FAM» для детекции кривых плавления дуплексов специфичного зонда и продукта амплификации для регистрации однонуклеотидного полиморфизма rs11676382 C/G гена *GGCX*.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

Для КО1 в канале детекции «FAM» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота rs11676382 C/C», и определяться значение температуры плавления.

Для КО2 в канале детекции «FAM» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота rs11676382 G/G», и определяться значение температуры плавления.

8.2. Анализ результатов определения однонуклеотидного полиморфизма rs11676382 C/G гена *GGCX*.

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в канале детекции «FAM» должен фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться значение температуры плавления.

8.2.2. Генотип анализируемого образца по полиморфизму rs11676382 C/G в гене *GGCX* учитывается как «Нормальная гомозигота rs11676382 C/C», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на

2 °С от температуры плавления для КО1.

8.2.3. Генотип анализируемого образца по полиморфизму rs11676382 C/G в гене *GGCX* учитывается как «Мутантная гомозигота rs11676382 G/G», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

8.2.4. Генотип анализируемого образца по полиморфизму rs11676382 C/G в гене *GGCX* учитывается как «Гетерозигота rs11676382 C/G», если для этого образца фиксируется наличие двух пиков плавления, при этом значение одного отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1, а температура второго отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

8.3. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2 °С от значений, полученных для КО1 и/или КО2. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту. В случае сомнительного результата необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

8.4. Диагностическая значимость определения генетических полиморфизмов для подбора индивидуальной дозы варфарина описана в литературе:

1. The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. Estimation of the warfarine dose with clinical and pharmacogenetic data. // N. Engl. J. Med. – 2009. – V. 360 – P. 753-764.
2. Eriksson N. and Wadelius M. Prediction of warfarin dose: why, when and how? // Pharmacogenomics. – 2012. – V. 13 – P. 429-440.
3. Gage BF, Eby C, Johnson JA, et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. // Clin. Pharmacol. Ther. – 2008. - V. 84. – P. 326–331.
4. Sanderson S., Emery J, Higgins J. CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGENet systematic review and meta-analysis. // Genet. Med. – 2005. – V. 7. – P. 97-104.
5. Сычев Д.А., Антонов И.М., Загребин С.В. и соавт. Алгоритмы дозирования варфарина, основанные на результатах фармакогенетического тестирования: реальная возможность оптимизации фармакотерапии. // Рациональная фармакотерапия и кардиология. – 2007. - № 2. – С. 59-66.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного

вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика Варфарин (GGCX)», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
АО «Вектор-Бест»

Сетт

А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

В.К. Ткачев

Руководитель отдела
«Клинические исследования»
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»
м.п.



Р.С. Годунов

Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 8 листов.

Отв. за учет договоров

ООО "Независимая лаборатория ИНВИТРО"

Годунов Р.С.

"31" июля 2012 г.



«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения
генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина,
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления

«РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*2/CYP2C9*3)»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*2/CYP2C9*3)» предназначен для определения однонуклеотидных полиморфизмов 430 С/Т гена CYP2C9 (CYP2C9*2) и 1075 А/С гена CYP2C9 (CYP2C9*3), влияющих на подбор индивидуальной дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой с последующим анализом кривых плавления.

Выделение ДНК из клинического материала (буккального эпителия, цельной крови) осуществляется с помощью наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для применения с регистрирующим амплификатором «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфич-

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

ных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота).

Наиболее важным для подбора индивидуальной дозы варфарина является определение полиморфизмов 430 С/Т гена *CYP2C9* (Arg144Cys, аллель *CYP2C9*2*), 1075 А/С гена *CYP2C9* (Ile359Leu, аллель *CYP2C9*3*), 1080 С/Г гена *CYP2C9* (Asp360Glu, аллель *CYP2C9*5*), 817 delA гена *CYP2C9* (аллель *CYP2C9*6*), 1297 С/Т гена *CYP4F2* (Val433Met, аллель *CYP4F2*3*), rs11676382 С/Г гена *GGCX* и гаплотипа *VKORC1*.

Полученный результат молекулярно-генетического анализа может быть использован лечащим врачом для подбора индивидуальной дозы варфарина с учётом выявленных генетических особенностей при помощи международного ресурса www.WarfarinDosing.org.

2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

- контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) – 1 пробирка, 1 мл;
- контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) – 1 пробирка, 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок;
- элюирующий раствор «Генетика» – 2 фл. по 12 мл.

Принадлежности:

- оптическая плёнка – 1 лист.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения однонуклеотидных полиморфизмов 430 С/Т гена *CYP2C9* и 1075 А/С гена *CYP2C9* определяется по стандартному образцу предприятия, СОП (рег. № 05-2-647).

Специфичность составляет 100% при условии, что генотип по полиморфизмам 430 С/Т гена *CYP2C9* и 1075 А/С гена *CYP2C9* в образцах №1 и №2 определяется в соответствии с инструкцией к СОП.

3.2. Для КО1 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления: по каналу «FAM» (42 ± 3) °C и по каналу «ROX» (44 ± 3) °C.

3.3. Для КО2 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления: по каналу «FAM» (52 ± 3) °C и по каналу «ROX» (53 ± 3) °C.

3.4. Диагностическая специфичность определения полиморфизмов 430 С/Т гена *CYP2C9* (*CYP2C9*2*) и 1075 А/С гена *CYP2C9* (*CYP2C9*3*): клинические испытания, проведенные на 216 образцах, показали 100% специфичность (интервал 98,6% - 100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

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

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»;

0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:
«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США);
- ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», АО «Ламинарные системы, Россия»);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- мини-шейкер PSU-2T (фирма «BioSan», Латвия);
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма «Eppendorf», Германия);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма «Biohit», Финляндия);
- встряхиватель для пробирок (Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTip», Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 – 2 мл и 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);
- магнитный штатив для пробирок (фирма АО «Вектор-Бест», Россия);
- нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа подготовить клинические образцы (буккального эпителия, цельной крови) с

помощью наборов для выделения ДНК «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

Выделение ДНК из образцов проводить без добавления внутреннего контрольного образца (ВКО). КО1 и КО2 проходят процедуру выделения ДНК аналогично положительному контрольному образцу (ПКО) (см. инструкцию набора для выделения).

Элюцию образцов проводить в 200 мкл элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить 400 мкл элюирующего раствора «Генетика», входящего в состав данного набора. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту. Установить пробирки в магнитный штатив.

6.1.2. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов проводить согласно инструкции набора. Пробы готовы к постановке ПЦР-анализа.

6.1.3. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 КО1 и 1 КО2) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2-8) °С составляет 3 месяца.

КО1 и КО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК человека и регистрации кривых плавления.

Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору и пп. 7.6.-7.9.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации и детекции кривых плавления:

— 1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °C до 75 °C с шагом 1 °C в течение 5 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °C – 1 минута.

7.7. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для регистрации однонуклеотидных полиморфизмов:

«FAM» – регистрация 430 C/T гена *CYP2C9*;

«ROX» – регистрация 1075 A/C гена *CYP2C9*.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

Для КО1 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

Для КО2 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

8.2. Анализ результатов определения однонуклеотидных полиморфизмов 430 C/T гена *CYP2C9* и 1075 A/C гена *CYP2C9*.

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в каналах детекции «FAM» и «ROX» должен фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготно-

го носительства) пика плавления и определяться значение температуры плавления.

8.2.2. Генотип анализируемого образца учитывается как «Нормальная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО1.

8.2.3. Генотип анализируемого образца учитывается как «Мутантная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО2.

8.2.4. Генотип анализируемого образца учитывается как «Гетерозигота», если для этого образца фиксируется наличие двух пиков плавления, при этом значение одного отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО1, а температура второго отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО2 (подробнее см. в Приложении к данной инструкции).

8.3. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2 °C от значений, полученных для КО1 и/или КО2. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту. В случае сомнительного результата необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

8.4. Диагностическая значимость определения генетических полиморфизмов для подбора индивидуальной дозы варфарина описана в литературе:

1. The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. Estimation of the warfarine dose with clinical and pharmacogenetic data. // N. Engl. J. Med. – 2009. – V. 360 – P. 753-764.

2. Eriksson N. and Wadelius M. Prediction of warfarin dose: why, when and how? // Pharmacogenomics. – 2012. – V. 13 – P. 429-440.

3. Gage BF, Eby C, Johnson JA, et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. // Clin. Pharmacol. Ther. – 2008. - V. 84. – P. 326–331.

4. Sanderson S., Emery J, Higgins J. CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGenet systematic review and meta-analysis. // Genet. Med. – 2005. – V. 7. – P. 97-104.

5. Сычев Д.А., Антонов И.М., Загребин С.В. и соавт. Алгоритмы дозирования варфарина, основанные на результатах фармакогенетического тестирования: реальная возможность оптимизации фармакотерапии. // Рациональная фармакотерапия и кардиология. – 2007. - № 2. – С. 59-66.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного

вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*2/CYP2C9*3)», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
АО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Руководитель отдела
«Клинические исследования»
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»
м.п.



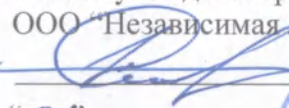
Р.С. Годунов

Ген	Полиморфизм	Канал	ГЕНОТИП		
			«Нормальная гомозигота»	«Мутантная гомозигота»	«Гетерозигота»
			Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО1	Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО2	Два пика плавления, отличаются не более чем на 2 °С от КО1 и КО2
<i>CYP2C9</i>	430 С/Т (аллель <i>CYP2C9*2</i>)	«FAM»	С/С	Т/Т	С/Т
<i>CYP2C9</i>	1075 А/С (аллель <i>CYP2C9*3</i>)	«ROX»	А/А	С/С	А/С

Пронумеровано, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.

Отв. за учет договоров

ООО "Независимая лаборатория ИНВИТРО"


"31" 



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения
генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина,
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления

«РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*5/CYP2C9*6)»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*5/CYP2C9*6)» предназначен для определения полиморфизмов 1080 C/G гена CYP2C9 (CYP2C9*5) и 818 delA гена CYP2C9 (CYP2C9*6), влияющих на подбор индивидуальной дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой с последующим анализом кривых плавления.

Выделение ДНК из клинического материала (буккального эпителия, цельной крови) осуществляется с помощью наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для применения с регистрирующим амплификатором «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота).

Наиболее важным для подбора индивидуальной дозы варфарина является определение полиморфизмов 430 С/Т гена *CYP2C9* (Arg144Cys, аллель *CYP2C9**2), 1075 А/С гена *CYP2C9* (Phe359Leu, аллель *CYP2C9**3), 1080 С/Г гена *CYP2C9* (Asp360Glu, аллель *CYP2C9**5), 818 delA гена *CYP2C9* (273 Frame shift, аллель *CYP2C9**6), 1297 С/Т гена *CYP4F2* (Val433Met, аллель *CYP4F2**3), rs11676382 С/Г гена *GGCX* и гаплотипа *VKORC1*.

Полученный результат молекулярно-генетического анализа может быть использован лечащим врачом для подбора индивидуальной дозы варфарина с учётом выявленных генетических особенностей при помощи международного ресурса www.WarfarinDosing.org.

2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

- контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) – 1 пробирка, 1 мл;
- контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) – 1 пробирка, 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок;
- элюирующий раствор «Генетика» – 2 фл. по 12 мл.

Принадлежности:

- оптическая плёнка – 1 лист.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения полиморфизмов 818 delA гена *CYP2C9* и 1080 С/Г гена *CYP2C9* определяется по стандартному образцу предприятия, СОП (рег. № 05-2-647).

Специфичность составляет 100 % при условии, что генотип по полиморфизмам 818 delA гена *CYP2C9* и 1080 С/Г гена *CYP2C9* в образцах №1 и №2 определяется в соответствии с инструкцией к СОП.

3.2. Для КО1 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления: по

каналу «HEX» (40 ± 3) °C и по каналу «ROX» (50 ± 3) °C.

3.3. Для КО2 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления: по каналу «HEX» (47 ± 3) °C и по каналу «ROX» (62 ± 3) °C.

3.4. Диагностическая специфичность определения полиморфизмов 1080 C/G гена *CYP2C9* (*CYP2C9*5*) и 818 delA гена *CYP2C9* (*CYP2C9*6*): клинические испытания, проведенные на 216 образцах, показали 100% специфичность (интервал 98,6% - 100%, с достоверной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

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

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфициру-

ющими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США);
- ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», АО «Ламинарные системы, Россия»);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- мини-шейкер PSU-2T (фирма «BioSan», Латвия);
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма «Eppendorf», Германия);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма «Biohit», Финляндия);
- встряхиватель для пробирок (Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTip», Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 – 2 мл и 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);
- магнитный штатив для пробирок (фирма АО «Вектор-Бест», Россия);
- нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа подготовить клинические образцы (буккального эпителия, цельной крови) с помощью наборов для выделения ДНК «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

Выделение ДНК из образцов проводить без добавления внутреннего контрольного образца (ВКО). КО1 и КО2 проходят процедуру выделения ДНК аналогично положительному контрольному образцу (ПКО) (см. инструкцию набора для выделения).

Элюцию образцов проводить в 200 мкл элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить 400 мкл элюирующего раствора «Генетика», входящего в состав данного набора. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту. Установить пробирки в магнитный штатив.

6.1.2. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов проводить согласно инструкции набора. Пробы готовы к постановке ПЦР-анализа.

6.1.3. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 КО1 и 1 КО2) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2-8) °С составляет 3 месяца.

КО1 и КО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК человека и регистрации кривых плавления.

Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору и пп. 7.6.-7.9.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации и детекции кривых плавления:

- 1 стадия: 50 °C – 2 минуты;
- 2 стадия: 95 °C – 2 минуты;
- 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд);
- 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °C до 75 °C с шагом 1 °C в течение 5 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);
- 5 стадия: 10 °C – 1 минута.

7.7. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для регистрации генетических полиморфизмов:

«HEX» – регистрация 818 delA гена *CYP2C9*;

«ROX» – регистрация 1080 C/G гена *CYP2C9*.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

Для KO1 в каналах детекции «HEX» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

Для KO2 в каналах детекции «HEX» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

8.2. Анализ результатов определения полиморфизмов и 818 delA гена *CYP2C9* и 1080 C/G гена *CYP2C9*.

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в каналах детекции «HEX» и «ROX» должен фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться значение температуры плавления.

8.2.2. Генотип анализируемого образца учитывается как «Нормальная гомозигота»,

если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1.

8.2.3. Генотип анализируемого образца учитывается как «Мутантная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

8.2.4. Генотип анализируемого образца учитывается как «Гетерозигота», если для этого образца фиксируется наличие двух пиков плавления, при этом значение одного отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1, а температура второго отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2 (подробнее см. в Приложении к данной инструкции).

8.3. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2 °С от значений, полученных для КО1 и/или КО2. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту. В случае сомнительного результата необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

8.4. Диагностическая значимость определения генетических полиморфизмов для подбора индивидуальной дозы варфарина описана в литературе:

1. The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. Estimation of the warfarine dose with clinical and pharmacogenetic data. // N. Engl. J. Med. – 2009. – V. 360 – P. 753-764.

2. Eriksson N. and Wadelius M. Prediction of warfarin dose: why, when and how? // Pharmacogenomics. – 2012. – V. 13 – P. 429-440.

3. Gage BF, Eby C, Johnson JA, et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. // Clin. Pharmacol. Ther. – 2008. - V. 84. – P. 326–331.

4. Sanderson S., Emery J, Higgins J. CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGENet systematic review and meta-analysis. // Genet. Med. – 2005. – V. 7. – P. 97-104.

5. Сычев Д.А., Антонов И.М., Загребин С.В. и соавт. Алгоритмы дозирования варфарина, основанные на результатах фармакогенетического тестирования: реальная возможность оптимизации фармакотерапии. // Рациональная фармакотерапия и кардиология. – 2007. - № 2. – С. 59-66.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного

вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*5/CYP2C9*6)», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
АО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Руководитель отдела
«Клинические исследования»
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»
м.п.



Р.С. Годунов

Ген	Полиморфизм	Канал	ГЕНОТИП		
			«Нормальная гомозигота»	«Мутантная гомозигота»	«Гетерозигота»
			Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °C от KO1	Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °C от KO2	Два пика плавления, отличаются не более чем на 2 °C от KO1 и KO2
CYP2C9	818 delA (аллель CYP2C9*6)	«HEX»	A/A	delA/delA	A/delA
CYP2C9	1080 C/G (аллель CYP2C9*5)	«ROX»	C/C	G/G	C/G

Пронумеровано, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.
Отв. за учет договоров
ООО "Независимая лаборатория ИНВИТРО"
Годунов Р.С.
31 мая 2014 г.

Пронумеровано, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.

Отв. за учет договоров

ООО "Независимая лаборатория ИНВИТРО"

Годунов Р.С.

201 ~~7~~

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения
генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина,
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления
«РеалБест-Генетика Варфарин (VKORC1/CYP4F2*3)»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «РеалБест-Генетика Варфарин» (VKORC1/CYP4F2*3) предназначен для определения однонуклеотидных полиморфизмов 1173 С/Т гена VKORC1 и 1297 С/Т гена CYP4F2 (CYP4F2*3), влияющих на подбор индивидуальной дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой с последующим анализом кривых плавления.

Выделение ДНК из клинического материала (буккального эпителия, цельной крови) осуществляется с помощью наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для применения с регистрирующим амплификатором «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота).

Наиболее важным для подбора индивидуальной дозы варфарина является определение полиморфизмов 430 C/T гена *CYP2C9* (Arg144Cys, аллель *CYP2C9*2*), 1075 A/C гена *CYP2C9* (Ile359Leu, аллель *CYP2C9*3*), 1080 C/G гена *CYP2C9* (Asp360Glu, аллель *CYP2C9*5*), 818 delA гена *CYP2C9* (273 Frame shift, аллель *CYP2C9*6*), 1297 C/T гена *CYP4F2* (Val433Met, аллель *CYP4F2*3*), rs11676382 C/G гена *GGCX* и гаплотипа *VKORC1*.

Полученный результат молекулярно-генетического анализа может быть использован лечащим врачом для подбора индивидуальной дозы варфарина с учётом выявленных генетических особенностей при помощи международного ресурса www.WarfarinDosing.org.

Для гена *VKORC1* выявлен гаплотип, формируемый основными однонуклеотидными полиморфизмами: -1639 G/A (другое обозначение 3673 G/A), 1173 C/T, 1542 G/C, 2255 C/T, 3730 G/A. Для определения гаплотипа достаточно убедиться в наличии хотя бы одного полиморфизма в любом из пяти положений. Таким образом, для *VKORC1* генотип нормальная гомозигота 1173 C/C соответствует генотипу -1639(3673) G/G; гетерозигота 1173 C/T соответствует генотипу -1639(3673) G/A; мутантная гомозигота 1173 T/T соответствует генотипу -1639(3673) A/A.

2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

- контрольный образец «Нормальная гомозигота» (KO1) – 1 пробирка, 1 мл;
- контрольный образец «Мутантная гомозигота» (KO2) – 1 пробирка, 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок;
- элюирующий раствор «Генетика» – 2 фл. по 12 мл.

Принадлежности:

- оптическая плёнка – 1 лист.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения полиморфизмов 1173 С/Т гена *VKORC1* и 1297 С/Т гена *CYP4F2* определяется по стандартному образцу предприятия, СОП (рег. № 05-2-647).

Специфичность составляет 100 % при условии, что генотип по полиморфизмам 1173 С/Т гена *VKORC1* и 1297 С/Т гена *CYP4F2* в образцах №1 и №2 определяется в соответствии с инструкцией к СОП.

3.2. Для КО1 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления: по каналу «HEX» (46 ± 3) °С и по каналу «ROX» (62 ± 3) °С.

3.3. Для КО2 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления: по каналу «HEX» (56 ± 3) °С и по каналу «ROX» (46 ± 3) °С.

3.4. Диагностическая специфичность определения полиморфизмов 1173 С/Т гена *VKORC1* и 1297 С/Т гена *CYP4F2* (*CYP4F2**3): клинические испытания, проведенные на 216 образцах, показали 100% специфичность (интервал 98,6% - 100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

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

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США);
- ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», АО «Ламинарные системы, Россия»);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- мини-шейкер PSU-2Т (фирма «BioSan», Латвия);
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма «Eppendorf», Германия);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма «Biohit», Финляндия);
- встряхиватель для пробирок (Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTip», Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 – 2 мл и 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);

- контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);
- магнитный штатив для пробирок (фирма АО «Вектор-Бест», Россия);
- нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа подготовить клинические образцы (буккального эпителия, цельной крови) с помощью наборов для выделения ДНК «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

Выделение ДНК из образцов проводить без добавления внутреннего контрольного образца (ВКО). КО1 и КО2 проходят процедуру выделения ДНК аналогично положительному контрольному образцу (ПКО) (см. инструкцию набора для выделения).

Элюцию образцов проводить в 200 мкл элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить 400 мкл элюирующего раствора «Генетика», входящего в состав данного набора. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту. Установить пробирки в магнитный штатив.

6.1.2. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов проводить согласно инструкции набора. Пробы готовы к постановке ПЦР-анализа.

6.1.3. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 КО1 и 1 КО2) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2-8) °С составляет 3 месяца.

КО1 и КО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК человека и регистрации кривых плавления.

Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору и пп. 7.6.-7.9.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации и детекции кривых плавления:

— 1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °C до 75 °C с шагом 1 °C

в течение 5 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °C – 1 минута.

7.7. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для регистрации генетических полиморфизмов:

«HEX» – регистрация 1173 C/T гена *VKORC1*;

«ROX» – регистрация 1297 C/T гена *CYP4F2*.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

Для KO1 в каналах детекции «HEX» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

Для КО2 в каналах детекции «HEX» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

8.2. Анализ результатов определения полиморфизмов 1173 С/Т гена *VKORC1* и 1297 С/Т гена *CYP4F2*.

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в каналах детекции «HEX» и «ROX» должен фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться значение температуры плавления.

8.2.2. Генотип анализируемого образца учитывается как «Нормальная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 3 °С от температуры плавления для КО1.

8.2.3. Генотип анализируемого образца учитывается как «Мутантная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 3 °С от температуры плавления для КО2.

8.2.4. Генотип анализируемого образца учитывается как «Гетерозигота», если для этого образца фиксируется наличие двух пиков плавления, при этом значение одного отличается не более чем на 3 °С от температуры плавления для КО1, а температура второго отличается не более чем на 3 °С от температуры плавления для КО2 (подробнее см. в Приложении к данной инструкции).

8.3. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 3 °С от значений, полученных для КО1 и/или КО2. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту. В случае сомнительного результата необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

8.4. Диагностическая значимость определения генетических полиморфизмов для подбора индивидуальной дозы варфарина описана в литературе:

1. The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. Estimation of the warfarine dose with clinical and pharmacogenetic data. // N. Engl. J. Med. – 2009. – V. 360 – P. 753-764.

2. Eriksson N. and Wadelius M. Prediction of warfarin dose: why, when and how? // Pharmacogenomics. – 2012. – V. 13 – P. 429-440.

3. Gage BF, Eby C, Johnson JA, et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. // Clin. Pharmacol. Ther. – 2008. - V. 84. – P. 326–331.

4. Sanderson S., Emery J, Higgins J. CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGENet systematic review and meta-analysis. // Genet. Med. – 2005. – V. 7. – P. 97-104.

5. Wadelius M., Chen L.Y., Downes K. et al. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. // The Pharmacogenomics Journal. – 2005. – V. 5. – P. 262–270.

6. Сычев Д.А., Антонов И.М., Загребин С.В. и соавт. Алгоритмы дозирования варфарина, основанные на результатах фармакогенетического тестирования: реальная возможность оптимизации фармакотерапии. // Рациональная фармакотерапия и кардиология. – 2007. - № 2. – С. 59-66.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика Варфарин (VKORC1/CYP4F2*3)», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
АО «Вектор-Бест»



А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Руководитель отдела
«Клинические исследования»
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»
м.п.



Р.С. Годунов

Ген	Полиморфизм	Канал	ГЕНОТИП		
			«Нормальная гомозигота»	«Мутантная гомозигота»	«Гетерозигота»
			Один пик плавления, отличается не более чем на 3 °C от KO1	Один пик плавления, отличается не более чем на 3 °C от KO2	Два пика плавления, отличаются не более чем на 3 °C от KO1 и KO2
<i>VKORC1</i>	1173 C/T	«HEX»	1173 C/C (-1639/3673 G/G)*	1173 T/T (-1639/3673 A/A)*	1173 C/T (-1639/3673 G/A)*
<i>CYP4F2</i>	1297 C/T (аллель CYP4F2*3)	«ROX»	C/C	G/G	C/G

*Обозначение, используемое в международном ресурсе www.WarfarinDosing.org.

Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.

Отв. за учет договоров
ООО "Независимая лаборатория ИНВИТРО"

Гол: нов Р.С.

"31" мая



ПАСПОРТ № 906-16

РеалБест-Генетика Варфарин (GGCX)

Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления

ТУ 9398-548-23548172-2016

Номер серии

Дата изготовления 2016-04-08

Дата выдачи паспорта 2016-04-08

Срок годности наборов до 2017-04-08

Хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток.

Наименование показателя	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Внешний вид		
Контрольный образец "Нормальная гомозигота" (КО1), серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
Контрольный образец "Мутантная гомозигота" (КО2), серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), серия 1	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок)	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок) (соответствует)
Буферный раствор "Генетика", серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл (соответствует)
Принадлежности:		
Оптическая пленка	1 лист	1 лист (соответствует)
Технические характеристики		
Температура плавления дуплекса специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для КО1, °C	(56±3) по каналу "FAM"	55 по каналу "FAM" (соответствует)
Температура плавления дуплекса специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для КО2, °C	(40±3) по каналу "FAM"	41 по каналу "FAM" (соответствует)
Специфичность определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, по стандартному образцу предприятия СОП 05-2-647, %	100	100 (соответствует)

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям
ТУ 9398-548-23548172-2016

Начальник ОБТК

В.В. ШАПРОВ



ПАСПОРТ № 1006-16

РеалБест-Генетика Варфарин (GGCX)

набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления

Копия верна

ТУ 9398-548-23548172-2016

Номер серии 2

Дата изготовления 2016-04-12

Дата выдачи паспорта 2016-04-12

Срок годности наборов до 2017-04-12

хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток.

Наименование показателя	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Внешний вид		
контрольный образец "Нормальная гомозигота" (КО1), серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
контрольный образец "Мутантная гомозигота" (КО2), серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), серия 2	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок)	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок) (соответствует)
буферный раствор "Генетика", серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл (соответствует)
Принадлежности:		
оптическая пленка	1 лист	1 лист (соответствует)
Технические характеристики		
температура плавления дуплекса специфичного ДНК-продукта и продукта амплификации для КО1, °C	(56±3) по каналу "FAM"	56 по каналу "FAM" (соответствует)
температура плавления дуплекса специфичного ДНК-продукта и продукта амплификации для КО2, °C	(40±3) по каналу "FAM"	40 по каналу "FAM" (соответствует)
специфичность определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, по стандартному образцу предприятия СОП 05-2-647, %	100	100 (соответствует)

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям ТУ 9398-548-23548172-2016

управляющий ОБТК

В.В. ШАПРОВ



ПАСПОРТ № 907-16

РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*2/CYP2C9*3)

Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления

Копия верна

ТУ 9398-548-23548172-2016

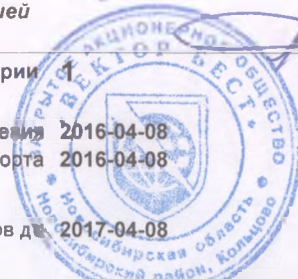
Номер серии 1

Дата изготовления 2016-04-08

Дата выдачи паспорта 2016-04-08

Срок годности наборов до 2017-04-08

Хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток.



Наименование показателя	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Внешний вид		
Контрольный образец "Нормальная гомозигота" (КО1), серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
Контрольный образец "Мутантная гомозигота" (КО2), серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), серия 1	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок)	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок) (соответствует)
Растворяющий раствор "Генетика", серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл (соответствует)
Принадлежности:		
Техническая пленка	1 лист	1 лист (соответствует)
Технические характеристики		
Температура плавления дуплекса специфического ДНК-продукта и продукта амплификации для КО1, °C	(42±3) по каналу "FAM" (44±3) по каналу "ROX"	42 по каналу "FAM" (соответствует) 44 по каналу "ROX" (соответствует)
Температура плавления дуплекса специфического ДНК-продукта и продукта амплификации для КО2, °C	(52±3) по каналу "FAM" (53±3) по каналу "ROX"	52 по каналу "FAM" (соответствует) 53 по каналу "ROX" (соответствует)
Специфичность определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, стандартному образцу предприятия СОП 05-2-647, %	100	100 (соответствует)

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям ТУ 9398-548-23548172-2016

Заместитель ОБТК

В.В. Шапоров

В.В. ШАПРОВ



ПАСПОРТ № 1007-16

РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*2/CYP2C9*3)

реактивов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления

Копия сертификата

ТУ 9398-548-23548172-2016

Номер серии 2

Дата изготовления 2016-04-12

Дата выдачи паспорта 2016-04-12

Срок годности наборов до 2017-04-12

хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток.



Наименование показателя	Характеристика и нормы	Результаты контроля
внешний вид		
контрольный образец "Нормальная гомозигота" (КО1), серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
контрольный образец "Мутантная гомозигота" (КО2), серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
исходная реакционная смесь для ПЦР (ГРС), серия 2	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок)	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок) (соответствует)
растворяющий раствор "Генетика", серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл (соответствует)
надлежности:		
рабочая пленка	1 лист	1 лист (соответствует)
технические характеристики		
температура плавления дуплекса специфичного ДНК-продукта и продукта амплификации для КО1, °C	(42±3) по каналу "FAM" (44±3) по каналу "ROX"	42 по каналу "FAM" (соответствует) 44 по каналу "ROX" (соответствует)
температура плавления дуплекса специфичного ДНК-продукта и продукта амплификации для КО2, °C	(52±3) по каналу "FAM" (53±3) по каналу "ROX"	52 по каналу "FAM" (соответствует) 53 по каналу "ROX" (соответствует)
специфичность определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, стандартному образцу предприятия СОП 05-2-647, %	100	100 (соответствует)

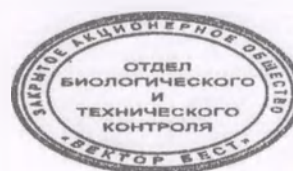
В комплект поставки входят: набор реактивов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям ТУ 9398-548-23548172-2016

подпись альник ОБТК

Handwritten signature

В.В. ШАПРОВ



ПАСПОРТ № 908-16

РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*5/CYP2C9*6)

Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления

ТУ 9398-548-23548172-2016

Номер серии 1

Дата изготовления 2016-04-08

Дата выдачи паспорта 2016-04-08

Срок годности наборов до 2017-04-08

Хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток.



Наименование показателя	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Внешний вид		
Контрольный образец "Нормальная гомозигота" (КО1), серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
Контрольный образец "Мутантная гомозигота" (КО2), серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
Базовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), серия 1	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок)	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок) (соответствует)
Буферный раствор "Генетика", серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл (соответствует)
Составляющие:		
Упаковочная пленка	1 лист	1 лист (соответствует)
Технические характеристики		
Температура плавления дуплекса специфического ДНК-продукта и продукта амплификации для КО1, °C	(40±3) по каналу "HEX" (50±3) по каналу "ROX"	41 по каналу "HEX" (соответствует) 50 по каналу "ROX" (соответствует)
Температура плавления дуплекса специфического ДНК-продукта и продукта амплификации для КО2, °C	(47±3) по каналу "HEX" (62±3) по каналу "ROX"	47 по каналу "HEX" (соответствует) 62 по каналу "ROX" (соответствует)
Специфичность определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, стандартному образцу предприятия СОП 05-2-647, %	100	100 (соответствует)

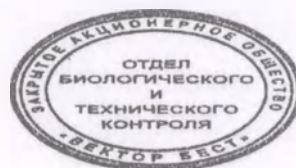
В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям ТУ 9398-548-23548172-2016

Менеджер ОБТК

Handwritten signature

В.В. ШАПРОВ



ПАСПОРТ № 1008-16

РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*5/CYP2C9*6)

реактивов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией
кривых плавления

ТУ 9398-548-23548172-2016

Номер серии

Дата изготовления: 2016-04-12

Дата выдачи паспорта: 2016-04-12

Срок годности наборов до: 2017-04-12

при температуре 2-8°C. Транспортировать при
температуре 2-8°C. Допускается транспортирование при
температуре до 25°C не более 10 суток.



Копия верна

Наименование показателя	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Внешний вид		
контрольный образец "Нормальная гомозигота" (КО1), серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
контрольный образец "Мутантная гомозигота" (КО2), серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
базовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), серия 2	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок)	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок) (соответствует)
буферный раствор "Генетика", серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл (соответствует)
Срок годности:		
печатная пленка	1 лист	1 лист (соответствует)
Технические характеристики		
температура плавления дуплекса специфичного ДНК- продукта и продукта амплификации для КО1, °C	(40±3) по каналу "HEX" (50±3) по каналу "ROX"	41 по каналу "HEX" (соответствует) 50 по каналу "ROX" (соответствует)
температура плавления дуплекса специфичного ДНК- продукта и продукта амплификации для КО2, °C	(47±3) по каналу "HEX" (62±3) по каналу "ROX"	47 по каналу "HEX" (соответствует) 62 по каналу "ROX" (соответствует)
специфичность определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, стандартному образцу предприятия СОП 05-2-647, %	100	100 (соответствует)

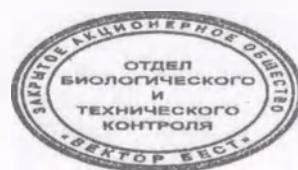
В комплект поставки входят: набор реактивов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям
ТУ 9398-548-23548172-2016

Менеджер ОБТК

В.В. ШАПРОВ

В.В. ШАПРОВ



ПАСПОРТ № 909-16

РеалБест-Генетика Варфарин (VKORC1/CYP4F2*3)

реактивов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы
на, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией
кривых плавления

ТУ 9398-548-23548172-2016

Номер серии 1

Дата изготовления 2016-04-08

Дата выдачи паспорта 2016-04-08

Срок годности наборов до 2017-04-08

при температуре 2-8°C. Транспортировать при
температуре 2-8°C. Допускается транспортирование при
температуре до 25°C не более 10 суток.

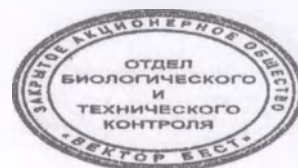
Наименование показателя	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Вид		
Исходный образец "Нормальная гомозигота" (KO1), мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
Исходный образец "Мутантная гомозигота" (KO2), мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
Реакционная смесь для ПЦР (ГРС), серия 1	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок)	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок) (соответствует)
Раствор "Генетика", серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл (соответствует)
Принадлежности:		
Печатная пленка	1 лист	1 лист (соответствует)
Технические характеристики		
Температура плавления дуплекса специфического ДНК- продукта и продукта амплификации для KO1, °C	(46±3) по каналу "HEX" (62±3) по каналу "ROX"	46 по каналу "HEX" (соответствует) 62 по каналу "ROX" (соответствует)
Температура плавления дуплекса специфического ДНК- продукта и продукта амплификации для KO2, °C	(56±3) по каналу "HEX" (46±3) по каналу "ROX"	56 по каналу "HEX" (соответствует) 46 по каналу "ROX" (соответствует)
Специфичность определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, стандартному образцу предприятия СОП 05-2-647, %	100	100 (соответствует)

В комплект поставки входят: набор реактивов, инструкция по применению, паспорт.

Вывод: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям
ТУ 9398-548-23548172-2016

Зав. ОВТК

В.В. ШАПРОВ



ПАСПОРТ № 1009-16

РеалБест-Генетика Варфарин (VKORC1/CYP4F2*3)

реактивов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления

ТУ 9398-548-23548172-2016

Номер серии: 2

Дата изготовления: 2016-04-12

Дата выдачи паспорта: 2016-04-12

Срок годности наборов до: 2017-04-12

Хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток.



Наименование показателя	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Внешний вид		
Контрольный образец "Нормальная гомозигота" (КО1), серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
Контрольный образец "Мутантная гомозигота" (КО2), серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
Базовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), серия 2	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок)	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок) (соответствует)
Буферный раствор "Генетика", серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 флакона по 12 мл (соответствует)
Содержимое:		
Пленка	1 лист	1 лист (соответствует)
Технические характеристики		
Температура плавления дуплекса специфического ДНК-продукта и продукта амплификации для КО1, °C	(46±3) по каналу "HEX" (62±3) по каналу "ROX"	46 по каналу "HEX" (соответствует) 62 по каналу "ROX" (соответствует)
Температура плавления дуплекса специфического ДНК-продукта и продукта амплификации для КО2, °C	(56±3) по каналу "HEX" (46±3) по каналу "ROX"	56 по каналу "HEX" (соответствует) 46 по каналу "ROX" (соответствует)
Специфичность определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, стандартному образцу предприятия СОП 05-2-647, %	100	100 (соответствует)

В комплект поставки входят: набор реактивов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям ТУ 9398-548-23548172-2016

Менеджер ОБТК

В.В. Шапоров

В.В. ШАПРОВ





Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
8 листов



«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»
М.Д. Хусаинов
«03» _____ 2016 г.

Образцы маркировки на Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления (РеалБест-Генетика Варфарин)

1. Образцы этикеток на компоненты набора «РеалБест-Генетика Варфарин (GGCX)»

Наименование компонента	Этикетка
Готовая реакционная смесь для ПЦР	
Контрольный образец «Нормальная гомозигота»	
Контрольный образец «Мутантная гомозигота»	
Элюирующий раствор «Генетика»	

2. Образцы этикеток на коробку набора «РеалБест-Генетика Варфарин (GGCX)»

2.1. Верхняя этикетка.

набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления
РеалБест-Генетика Варфарин (GGCX)
состав: 1. Контрольный образец «Нормальная гомозигота» 2. Контрольный образец «Мутантная гомозигота» 3. Готовая реакционная смесь для ПЦР 4. Элюирующий раствор «Генетика» Принадлежности: Оптическая пленка
ТУ 9398-548-23548172-2016 РУ

2.2. Боковая этикетка.

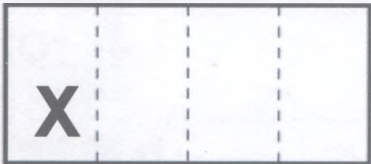
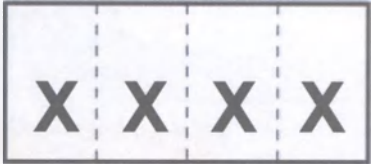
РеалБест-Генетика Варфарин (GGCX)

Примечание. Непосредственно на коробку типографским способом наносятся следующие надписи:

1. ЗАО «Вектор-Бест»

2. Россия, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово, тел/факс: (383) 332-67-49, 332-67-52

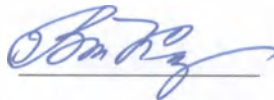
3. Образцы этикеток на ящик для наборов "РеалБест-Генетика Варфарин (GGCX)"

		D-XXXX			набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления			
					РеалБест-Генетика Варфарин (GGCX)			
		XXXX-XX-XX						
		YYYY-YY-YY				X		
								
Масса нетто набора		XX кг						
Масса нетто		XX кг						
Масса брутто		XX кг		Кол-во наборов				
								
								ЗАО «Вектор-Бест» 630559 Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, АБК

«СОГЛАСОВАНО»

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

Коммерческий директор
ЗАО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

«05» апреля 2016 г.

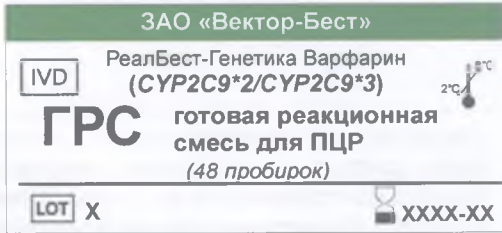
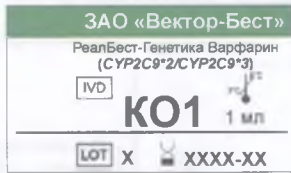
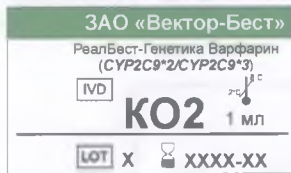
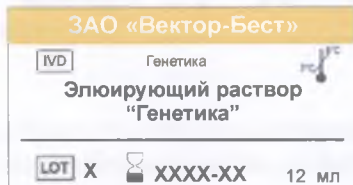


Ю.М. Гусев

«05» апреля 2016 г.

Образцы маркировки на Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления (РеалБест-Генетика Варфарин)

Образцы этикеток на компоненты набора «РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*2/CYP2C9*3)»

Наименование компонента	Этикетка
Готовая реакционная смесь для ПЦР	
Контрольный образец «Нормальная гомозигота»	
Контрольный образец «Мутантная гомозигота»	
Элюирующий раствор «Генетика»	

2. Образцы этикеток на коробку набора «РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*2/CYP2C9*3)»

2.1. Верхняя этикетка.

набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления

**РеалБест-Генетика
Варфарин (CYP2C9*2/CYP2C9*3)**

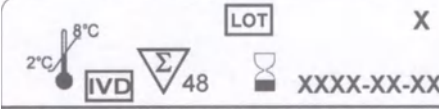
состав:

1. Контрольный образец «Нормальная гомозигота»
2. Контрольный образец «Мутантная гомозигота»
3. Готовая реакционная смесь для ПЦР
4. Элюирующий раствор «Генетика»

Принадлежности:
Оптическая пленка

ТУ 9398-548-23548172-2016
РУ

2.2. Боковая этикетка.



**РеалБест-Генетика
Варфарин (CYP2C9*2/CYP2C9*3)**

Примечание. Непосредственно на коробку типографским способом наносятся следующие надписи:

1. ЗАО «Вектор-Бест»

2. Россия. 630559. Новосибирская обл., п. Кольцово, тел/факс: (383) 332-67-49, 332-67-52

3. Образцы этикеток на ящик для наборов "РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*2/CYP2C9*3)*"

	 REF	D-XXXX			набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления			
		РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*2/CYP2C9*3)						
		XXXX-XX-XX						
		YYYY-YY-YY			 LOT	X 		
								X X X X
	Масса нетто набора		XX кг					
	Масса нетто		XX кг					
	Масса брутто		XX кг		Кол-во наборов			
	 2°C / 8°C				ЗАО «Вектор-Бест» 630559 Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, АБК			

«СОГЛАСОВАНО»

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

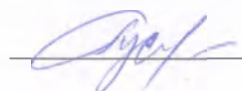
Коммерческий директор
ЗАО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

«05» апреля

2016 г.



Ю.М. Гусев

«05» апреля

2016 г.

Образцы маркировки на Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления (РеалБест-Генетика Варфарин)

Образцы этикеток на компоненты набора «РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*5/CYP2C9*6)»

Наименование компонента	Этикетка
Готовая реакционная смесь для ПЦР	
Контрольный образец «Нормальная гомозигота»	
Контрольный образец «Мутантная гомозигота»	
Элюирующий раствор «Генетика»	

2. Образцы этикеток на коробку набора «РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*5/CYP2C9*6)»

2.1. Верхняя этикетка.

набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления

РеалБест-Генетика
Варфарин (CYP2C9*5/CYP2C9*6)

состав:

1. Контрольный образец «Нормальная гомозигота»
2. Контрольный образец «Мутантная гомозигота»
3. Готовая реакционная смесь для ПЦР
4. Элюирующий раствор «Генетика»

Принадлежности:
Оптическая пленка

ТУ 9398-548-23548172-2016
РУ

2.2. Боковая этикетка.

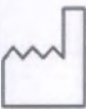
РеалБест-Генетика
Варфарин (CYP2C9*5/CYP2C9*6)

Примечание. Непосредственно на коробку типографским способом наносятся следующие надписи:

1. ЗАО «Вектор-Бест»

2. Россия, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово, тел/факс: (383) 332-67-49, 332-67-52

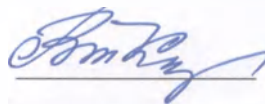
3. Образцы этикеток на ящик для наборов "РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*5/CYP2C9*6)"

	 REF	D-XXXX	набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления			
		РеалБест-Генетика Варфарин (CYP2C9*5/CYP2C9*6)				
		XXXX-XX-XX				
		YYYY-YY-YY	 LOT	X 		
Масса нетто набора XX кг						
Масса нетто XX кг						
Масса брутто XX кг		Кол-во наборов		X X X X		
 2°C / 8°C				ЗАО «Вектор-Бест» 630559 Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, АБК		

«СОГЛАСОВАНО»

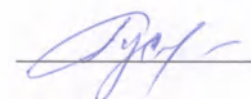
Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

Коммерческий директор
ЗАО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

«05» апреля 2016 г.

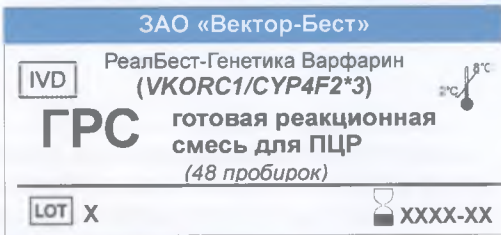
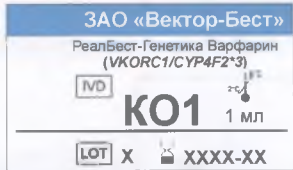
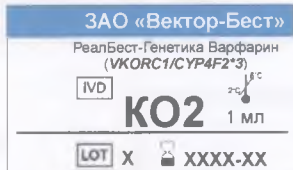
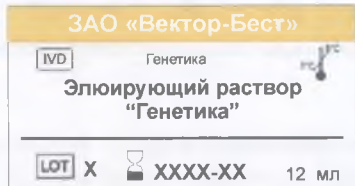


Ю.М. Гусев

«05» апреля 2016 г.

**Образцы маркировки на Набор реагентов для определения генетических
иморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции
в режиме реального времени с детекцией кривых плавления
(РеалБест-Генетика Варфарин)**

Образцы этикеток на компоненты набора «РеалБест-Генетика Варфарин (VKORC1/CYP4F2*3)»

Наименование компонента	Этикетка
Готовая реакционная смесь для ПЦР	
Контрольный образец “Нормальная гомозигота”	
Контрольный образец “Мутантная гомозигота”	
Элюирующий раствор “Генетика”	

2. Образцы этикеток на коробку набора «РеалБест-Генетика Варфарин (VKORC1/CYP4F2*3)»

2.1. Верхняя этикетка.

набор реагентов для определения генетических
полиморфизмов, влияющих на подбор дозы
варфарина, методом полимеразной цепной
реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления

**РеалБест-Генетика
Варфарин (VKORC1/CYP4F2*3)**

состав:

1. Контрольный образец “Нормальная гомозигота”
2. Контрольный образец “Мутантная гомозигота”
3. Готовая реакционная смесь для ПЦР
4. Элюирующий раствор “Генетика”

Принадлежности:
Оптическая пленка

ТУ 9398-548-23548172-2016
РУ

2.2. Боковая этикетка.



8°C
2°C

IVD

Σ 48

LOT

XXXX-XX-XX

**РеалБест-Генетика
Варфарин (VKORC1/CYP4F2*3)**

Примечание. Непосредственно на коробку типографским способом наносятся следующие надписи:

1. ЗАО “Вектор-Бест”

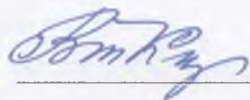
2. Россия, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово, тел/факс: (383) 332-67-49, 332-67-52

3. Образцы этикеток на ящик для наборов "РеалБест-Генетика Варфарин (VKORC1/CYP4F2*3)"

	 REF	D-XXXX			набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, влияющих на подбор дозы варфарина, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления			
		РеалБест-Генетика Варфарин (VKORC1/CYP4F2*3)						
		XXXX-XX-XX						
		YYYY-YY-YY			 LOT	X 		
								X X X X
	Масса нетто набора		XX кг					
	Масса нетто		XX кг					
	Масса брутто		XX кг		Кол-во наборов			
					ЗАО «Вектор-Бест» 630559 Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, АБК			

«СОГЛАСОВАНО»

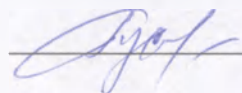
Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

«05» апреля 2016 г.

Коммерческий директор
ЗАО «Вектор-Бест»



Ю.М. Гусев

«05» апреля 2016 г.



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
8 листов

[Handwritten signature]