

«УТВЕРЖДАЮ»

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



В.Г. Акимкин
2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для определения генетического риска
развития ишемического инсульта на основании анализа
полиморфных ДНК маркеров методом ПЦР
в реальном времени

«АмплиСенс® Геноскрин Stroke SNP-FL»



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	11
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	14
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	14
СОСТАВ	15
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	17
А. Подготовка проб для амплификации	18
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	18
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	19
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	23
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	24
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»	25
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Методика определения генетического риска развития инсульта	28
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	35

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

K+	- положительный контроль ПЦР
K-	- отрицательный контроль ПЦР
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
SNP	- однонуклеотидный полиморфизм
rs	- reference SNP (идентификационный номер полиморфного ДНК локуса в международных базах данных SNP)
ОП (+)	- отношение правдоподобия положительного результата
ОП (-)	- отношение правдоподобия отрицательного результата
OR	- odds ratio, отношение шансов (ОШ)
p	- уровень значимости

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® Геноскрин Stroke SNP-FL» предназначен для определения генотипов однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах, ассоциированных с риском развития ишемического инсульта, в биологическом материале (цельная кровь) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Набор реагентов используется при обследовании лиц на генетическую предрасположенность к развитию ишемического инсульта, а также для изучения генетики других мультифакторных заболеваний, ассоциированных с определяемыми полиморфизмами.

Расчет риска развития ишемического инсульта с использованием набора реагентов проводится на основании только генетических данных, средовые факторы риска и особенности образа жизни пациента не учитываются.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов может быть применен в медицинской практике при обследовании взрослых лиц обоих полов, относящихся к европеоидной расе, с целью определения генетического риска развития ишемического инсульта

(кардиоэмболического и атеротромботического подтипов) и проведения профилактических мероприятий.

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

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на экстракции тотальной ДНК человека из образцов биологического материала и проведении амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» фрагментов ДНК человека, содержащих SNP, в генах, ассоциированных с риском развития инсульта.

Полный анализ одного образца проводится в 19 пробирках, в каждой из которых определяется один полиморфный ДНК маркер. Набор реагентов позволяет дифференцировать гомо- и гетерозиготное состояние по каждому из исследуемых SNP.

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 10 и «ПЦР-комплект».

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект».

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала и амплификацию ДНК с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Таблица 1

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность
Цельная кровь	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект»	10 ГЭ в реакцию ¹

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов (доля правильных определений относительно референтного метода) проверялась на 200 образцах геномной ДНК человека. В качестве референтного метода была использована методика секвенирования с использованием пиросеквенатора «PyroMark Q24». При проведении тестирования неспецифических реакций и неправильного определения SNP и генотипов выявлено не было, аналитическая специфичность составила 100%.

Воспроизводимость и повторяемость

Воспроизводимость и повторяемость анализа были определены для всех 19 ПЦР-смесей-Lyo с использованием панели стандартных образцов предприятия с использованием двух серий набора. Панель включала восемь повторов каждого образца, тестирование проводили в разные дни. Для каждой пробы определяли значения пороговых циклов для каналов флуоресценции FAM и JOE и рассчитывали разность значений Ct (ΔCt) между каналами. Для определения повторяемости анализа рассчитывали среднее значение ΔCt и стандартное

¹ Соответствует 800 копиям/мл в выделенной и разведенной в 30 раз ДНК-пробе или $2,4 \times 10^4$ копий ДНК в 1 мл исследуемого биологического материала.

отклонение для восьми повторов по каждому из трех генотипов. Для определения воспроизводимости анализа сравнивали средние значения ΔCt по каждому из трех генотипов, полученные в двух независимых постановках.

Разброс значений внутри одного теста

Среднее значение ΔCt для образцов, соответствующих гомозиготным генотипам, составляло для разных ПЦР-смесей-Lyo от $2,2 \pm 0,28$ до $12,3 \pm 0,42$. Среднее значение ΔCt для образцов, соответствующих гетерозиготным генотипам, составляло для разных ПЦР-смесей-Lyo от $0,07 \pm 0,07$ до $0,47 \pm 0,29$.

Разброс значений между тестами, поставленными в разные дни

Среднее значение ΔCt для образцов, соответствующих гомозиготным генотипам, составляло для разных ПЦР-смесей-Lyo от $2,3 \pm 0,02$ до $11,5 \pm 0,14$. Среднее значение ΔCt для образцов, соответствующих гетерозиготным генотипам, составляло для разных ПЦР-смесей-Lyo от $0,13 \pm 0,06$ до $0,38 \pm 0,12$.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Результаты тестирования набора реагентов «АмплиСенс® Геноскрин Stroke SNP-FL» в сравнении с референтным методом

Точность определения аллелей SNP, детектируемых набором реагентов «АмплиСенс® Геноскрин Stroke SNP-FL», проверяли на 727 образцах цельной крови. В качестве референтного метода была использована методика секвенирования с использованием пиросеквенатора «PyroMark Q24». При проведении тестирования расхождений между двумя методами выявлено не было.

Клиническая эффективность набора реагентов «АмплиСенс® Геноскрин Stroke SNP-FL» (способность давать результаты, коррелирующие с конкретным клиническим состоянием в целевой популяции, то есть доля случаев инсульта, объясняемая вкладом генетических факторов риска) была рассчитана для двух групп SNP потенциальных факторов риска (см.табл. 4) на выборке из 727 образцов цельной крови, в

том числе 367 образцов, полученных от пациентов с ишемическим инсультом в анамнезе (из них 124 образца от пациентов с кардиоэмболическим подтипом и 243 образца от пациентов с атеротромботическим подтипом ишемического инсульта), и 360 образцов от пациентов без ишемического инсульта в анамнезе (контрольная группа), и составила для группы SNP «Инсульт-1» $OR=1,27$, $ОП(+)=1,13$, $ОП(-)=0,89$; для группы SNP «Артериальная гипертензия» $OR=1,49$, $ОП(+)=1,21$, $ОП(-)=0,89$.

Для кардиоэмболического и атеротромботического подтипов ишемического инсульта были показаны следующие статистически значимые показатели OR и $ОП$. Объемы тестируемых выборок и соответствующие значения представлены в таблицах 2, 3.

Таблица 2

**Таблица сопряженности по группе SNP «Инсульт-1»
(кардиоэмболический подтип ишемического инсульта)**

Группа пациентов	Признак позитив (генетическая предрасположенность к ишемическому инсульту)	Признак негатив (отсутствие генетической предрасположенности к ишемическому инсульту)	Всего	OR (95% доверительный интервал)	p	$ОП+/ОП-$
Пациенты с кардиоэмболическим подтипом ишемического инсульта в анамнезе	75	49	124	1,85 (1,20 – 2,87)	0,004	1,58/ 0,86
Контрольная группа без инсульта в анамнезе	163	197	360			
Всего	238	246	484			

Таблица 3

Таблица сопряженности по группе SNP «Артериальная гипертензия» (атеротромботический подтип ишемического инсульта)

Группа пациентов	Признак позитив (генетическая предрасположенность к ишемическому инсульту)	Признак негатив (отсутствие генетической предрасположенности к ишемическому инсульту)	Всего	OR (95% доверительный интервал)	<i>p</i>	ОП+/ОП-
Пациенты с атеротромботическим подтипом ишемического инсульта в анамнезе	99	144	243	1,58 (1,11 – 2,26)	0,009	1,30/ 0,82
Контрольная группа без инсульта в анамнезе	109	251	360			
Всего	208	395	603			

Исследование о возможности применения данного набора реагентов у лиц, не относящихся к европеоидной расе, не проводилось.

Согласно ГОСТ 53022.3 значение ОП(+)>10 или ОП(-)<0,1 служит основой для окончательного диагностического решения, значение ОП(+) от 5 до 10 и ОП(-) от 0,1 до 0,2 дает умеренные основания для диагностического решения, ОП(+) от 2 до 5 и ОП(-) от 0,5 до 0,2 мало дает для изменения оценки вероятности болезни у пациента, ОП(+) и ОП(-) от 0,5 до 2 почти не изменяет вероятности (шансы) болезни у пациента.

Методика определения генетического риска развития инсульта представлена в Приложении 2.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»,

СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку², биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого,

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром³. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и

³ Для удаления надосадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

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

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

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для формы комплектации, не включающей комплект реагентов «РИБО-преп»):

При использовании по ~~назначению~~ и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для формы комплектации, включающей комплект реагентов «РИБО-преп»):

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

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

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека (для всех форм комплектации):

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Пробирки вакуумные для взятия, хранения и транспортировки проб крови для лабораторных исследований in vitro (например, Green Vac-Tube, Green

Cross Medical Science Corporation, Корея), с ЭДТА в качестве антикоагулянта.

2. Иглы стерильные двусторонние трубчатые к вакуумным пробиркам для взятия венозной крови для лабораторных исследований in vitro (например, Green-Vac®, Shina Corporation, («Шина Корпорейшн»), Корея).

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

3. Реагент «ГЕМОЛИТИК» для селективного лизиса эритроцитов крови при предобработке цельной крови (РУ № ФСР 2010/09505) – при работе с формой комплектации 2.
4. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК – «РИБО-преп» (РУ № ~~ФСР~~ 2008/03147) или другие, рекомендованные Изготовителем – при работе с формой комплектации 2.
5. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, и до 1000 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
8. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
9. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
10. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
11. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
12. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °C (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
13. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой

- для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
14. Автоматические дозаторы переменного объема (например, например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 15. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 16. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 17. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

18. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 0,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.
19. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
20. Штативы для пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
21. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР- «Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
22. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
23. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
24. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США, «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология»), Россия).
25. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
26. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки

по МУ 1.3.2569-09.

27.Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служит цельная кровь. Взятие, транспортирование и хранение биологического материала проводить в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, и СП 1.3.2322-08.

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Цельная кровь

Взятие крови проводится в количестве 2,0 мл в одноразовую пробирку с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с цельной кровью переворачивают 3-4 раза для равномерного перемешивания с ЭДТА. Допускается хранение образца цельной крови при температуре от 2 до 8 °С не более 12 ч.

СОСТАВ

«РИБО-преп» вариант 10 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ⁴	3,0	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	4,0	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	2,0	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	5 пробирок
Гемолитик	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 10 проб. Входит в состав формы комплектации 1.

«ПЦР-комплект» – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК человека, содержащих SNP в генах, ассоциированных с риском развития инсульта, с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПКО ДНК 1	Прозрачная бесцветная жидкость	1,3	1 пробирка
ПКО ДНК 2	Прозрачная бесцветная жидкость	1,3	1 пробирка
ПКО ДНК 3	Прозрачная бесцветная жидкость	1,3	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,3	1 пробирка
ПЦР-смесь-Lyo-3	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-10	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-14	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-15	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-16	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-17	Порошок белого цвета	-	8 пробирок

⁴ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
			объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-19	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-20	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-21	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-22	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-23	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-25	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-29	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-30	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-31	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-35	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-39	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-42	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Lyo-43	Порошок белого цвета	-	8 пробирок объемом 0,2 мл

Комплект реагентов рассчитан на одновременный анализ с 19-тью ПЦР-смесями-Lyo 4-х биологических и 4-х контрольных образцов, (всего 152 реакции амплификации). При решении различных клинических задач возможно использование различных комбинаций ПЦР-смесей-Lyo.

Сочетания ПЦР-смесей-Lyo, по ассоциированным с инсультом группам SNP представлены в таблице 4.

Таблица 4

Номер ПЦР-смеси-Lyo	Группа SNP (описание)
ПЦР-смесь-Lyo-3	«Инсульт-1» (Группа SNP, ассоциированных с риском развития инсульта)
ПЦР-смесь-Lyo-10	
ПЦР-смесь-Lyo-15	
ПЦР-смесь-Lyo-19	
ПЦР-смесь-Lyo-20	
ПЦР-смесь-Lyo-22	
ПЦР-смесь-Lyo-30	
ПЦР-смесь-Lyo-35	
ПЦР-смесь-Lyo-14	«Артериальная гипертензия» (Группа SNP, ассоциированных с развитием артериальной гипертензии, как одного из факторов, связанных с риском развития инсульта)
ПЦР-смесь-Lyo-16	
ПЦР-смесь-Lyo-17	
ПЦР-смесь-Lyo-21	
ПЦР-смесь-Lyo-23	
ПЦР-смесь-Lyo-25	
ПЦР-смесь-Lyo-29	
ПЦР-смесь-Lyo-31	
ПЦР-смесь-Lyo-39	
ПЦР-смесь-Lyo-42	
ПЦР-смесь-Lyo-43	

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов.

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов для ручной или автоматической экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

При работе с формой комплектации 1 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 10 в соответствии с **Приложением 1** «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп».

Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

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

А. Подготовка проб для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 25 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).
2. В подготовленные пробирки внести по **25 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! Для проведения ПЦР рекомендуется использовать оптимальную концентрацию ДНК, которая составляет 10 нг в 25 мкл.

3. Поставить контрольные реакции для каждой реакционной смеси:
 - а) отрицательный контроль ПЦР (К–) – внести в пробирку 25 мкл ДНК-буфера.
 - б) положительный контроль ПЦР (К1+) – внести в пробирку 25 мкл ПКО ДНК 1.
 - в) положительный контроль ПЦР (К2+) – внести в пробирку 25 мкл ПКО ДНК 2.
 - г) положительный контроль ПЦР (К3+) – внести в пробирку 25 мкл ПКО ДНК 3.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 5).

Таблица 5

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁵ и планшетного типа⁶

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	95	10 мин	–	1
2	95	3 с	–	5
	60	15 с	–	
3	95	3 с	–	35
	60	15 с	FAM, JOE	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM и JOE.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам. В таблице 6 указаны каналы, по которым детектируются нуклеотидные варианты исследуемых SNP. ПКО ДНК 1 детектируется по каналу FAM, ПКО ДНК 2 детектируется по каналу JOE и ПКО ДНК 3 детектируется по обоим каналам флуоресцентной детекции.

⁵ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Германия) или другие, рекомендованные Изготовителем.

⁶ Например, «ДТ-96» («НПО ДНК-Технология», Россия) или другие, рекомендованные Изготовителем.

Таблица 6

Реакционная смесь (SNP)	rs	Детектируемые аллели	
		Канал для флуорофора FAM	Канал для флуорофора JOE
ПЦР-смесь-Lyo-3	rs1799983	G	T
ПЦР-смесь-Lyo-10	rs7193343	C	T
ПЦР-смесь-Lyo-14	rs3918226	C	T
ПЦР-смесь-Lyo-15	rs556512	C	T
ПЦР-смесь-Lyo-16	rs11110912	C	G
ПЦР-смесь-Lyo-17	rs6997709	G	T
ПЦР-смесь-Lyo-19	rs4044210	C	T
ПЦР-смесь-Lyo-20	rs5998322	C	T
ПЦР-смесь-Lyo-21	rs2398162	A	G
ПЦР-смесь-Lyo-22	rs12932445	C	T
ПЦР-смесь-Lyo-23	rs16998073	A	T
ПЦР-смесь-Lyo-25	rs1530440	C	T
ПЦР-смесь-Lyo-29	rs1378942	G	T
ПЦР-смесь-Lyo-30	rs2200733	C	T
ПЦР-смесь-Lyo-31	rs2820037	A	T
ПЦР-смесь-Lyo-35	rs702553	A	T
ПЦР-смесь-Lyo-39	rs17367504	A	G
ПЦР-смесь-Lyo-42	rs1937506	A	G
ПЦР-смесь-Lyo-43	rs7961152	A	C

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе в таблице результатов.

ВНИМАНИЕ! Анализ результатов для каждой реакционной смеси (каждого SNP) проводится отдельно.

Анализ результатов амплификации контрольных образцов

1. На основании данных флуоресценции контрольных образцов ПКО ДНК 1 и ПКО ДНК 2 задать для каждой ПЦР-смеси для обоих каналов флуоресценции значение пороговой линии (см вкладыш к набору реагентов).

2. В случае если разница в значениях пороговых циклов между двумя каналами для образца ПКО ДНК 3 превышает указанное во вкладыше, вручную скорректировать значение пороговой линии.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если для каждой реакционной смеси получены правильные результаты для отрицательного и положительных контролей амплификации в соответствии с табл. 7.

Таблица 7

Результаты для контрольных образцов ПЦР-исследования

Контроль	Значение порогового цикла, C_t	
	Канал FAM	Канал JOE
K–	Отсутствует	Отсутствует
K1+	Определено	Отсутствует или разница значений C_t между каналами больше указанного во вкладыше
K2+	Отсутствует или разница значений C_t между каналами больше указанного во вкладыше	Определено
K3+	Определено	Определено

Анализ результатов амплификации и детекция генотипов в исследуемых клинических образцах

ВНИМАНИЕ! Анализ результатов для каждой реакционной смеси (каждого SNP) проводится отдельно.

1. Для каждого образца анализируются значения пороговых циклов для каналов флуоресценции FAM и JOE.
2. Если для исследуемого образца по каналу FAM определено значение C_t , а по каналу JOE значение C_t отсутствует или разница значений C_t между каналами больше указанного во вкладыше – выявлен гомозиготный генотип по каналу FAM (см. табл. 6).
3. Если для исследуемого образца по каналу JOE определено значение C_t , а по каналу FAM значение C_t отсутствует или разница значений C_t между каналами больше указанного во вкладыше – выявлен гомозиготный генотип по каналу JOE (см. табл. 6).
4. Если для сигналов по каналам FAM и JOE определено значение C_t и разница значений C_t между каналами не

превышает указанного во вкладыше – выявлен гетерозиготный генотип (см. табл. 6).

Возможные ошибки:

1. Если результат ПЦР-исследования для хотя бы одного из положительных контролей ПЦР (K1+, K2+, K3+) не соответствует указанному в табл.7, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа амплификации.
2. Если для отрицательного контроля ПЦР (K–) на любой реакционной смеси по одному из каналов флуоресценции детектируется положительный сигнал, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых на этой реакционной смеси по данному каналу в таблице результатов было получено значение C_t , начиная с этапа амплификации. Для исключения вероятности контаминации образцов на этапе экстракции рекомендуется дополнительно анализировать отрицательный контроль этапа экстракции.
3. Если для образца разница значений C_t между каналами находится в диапазоне 1-2, генотип не определен. Для этого образца необходимо повторить анализ, начиная с этапа амплификации.
4. Если для пробы не определены значения C_t по обоим каналам, необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа амплификации. В случае если значения C_t отсутствуют для всех ПЦР-смесей, необходимо повторить анализ, начиная с этапа экстракции ДНК.

После проведения анализа и определения аллельных вариантов или их сочетаний для исследуемых SNP формируется генетическая карта пациента, включающая выявленные аллели в гомо- или гетерозиготном состоянии для каждого полиморфного ДНК локуса.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-преп», «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смеси-Луо хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® Геноскрин Stroke SNP-FL» направлять в отдел рекламаций, организации обучения и контроля качества по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru⁷

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение в отдел рекламаций по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»
УДП РФ



Е.В.Ржевская

⁷ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»

Порядок работы.

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

А. Подготовка клинического материала при экстракции ДНК из цельной крови

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный контроль экстракции). Промаркировать пробирки.
2. В пробирки, предназначенные для клинических проб, внести отдельными наконечниками по **1,0 мл гемолитика** и по **100 мкл** исследуемых образцов цельной крови в соответствии с маркировкой. Закрыть пробирки и аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе.
3. Оставить пробирки при комнатной температуре на 5 мин; еще раз аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе; оставить на 5 мин.
4. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин.
5. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Полученный осадок лейкоцитов можно хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 2 недель или при температуре не выше минус 68 °С в течение 1 года.

Б. Процедура экстракции ДНК

1. В промаркированные пробирки с клиническим материалом внести по **300 мкл раствора для лизиса**.
2. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
3. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.
4. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 12 тыс g (например, 13 400 об/мин для

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

- центрифуги MiniSpin, Eppendorf).
5. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** для каждой пробы.
 6. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
 7. Процентрифугировать при **12 тыс g** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
 8. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 9. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
 10. Центрифугировать при **12 тыс g** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
 11. Осторожно, не захватывая осадок, тщательно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 12. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
 13. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
 14. Центрифугировать пробирки при **12 тыс g** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.
- ВНИМАНИЕ!** Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8 °C, в течение 1 года при температуре от минус 24 до минус 16 °C и длительно при температуре не выше минус 68 °C.
15. Перед проведением ПЦР полученную ДНК развести в 30 раз ДНК-буфером.

ВНИМАНИЕ! Для проведения ПЦР рекомендуется

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

использовать оптимальную концентрацию ДНК, которая составляет 10 нг в 25 мкл.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Методика определения генетического риска развития инсульта

Расчет относительных рисков развития инсульта проводится по мультипликативной модели [Padhukasahasram B, Halperin E, Wessel J, Thomas DJ, Silver E, et al. (2010) Presymptomatic Risk Assessment for Chronic Non-Communicable Diseases. PLoS ONE 5(12): e14338] следующим образом.

Для каждого SNP предполагаются известными отношения шансов (ОШ) гетерозиготы (OR2) и гомозиготы (OR3) по мутантному аллелю относительно гомозиготы по дикому аллелю и частоты встречаемости генотипов в популяции (F1, F2, и F3, то есть частоты гомозигот по дикому аллелю, гетерозигот (OR2) и гомозигот (OR3) по мутантному аллелю, соответственно). Величины OR2 и OR3 берутся непосредственно из публикаций; величины F1, F2, и F3 для популяции европеоидов (Caucasian) берутся из базы данных dbSNP (National Center for Biotechnological Information).

В случае если пациент не относится к европеоидной расе, для расчета следует использовать величины OR2, OR3, F1, F2, и F3, для соответствующей популяции. Возможность применения набора реагентов для расчета генетического риска развития инсульта у лиц, не относящихся к европеоидной расе, при разработке набора не исследовалась.

Средний популяционный риск (average population risk, APR) по отдельному SNP вычисляется по формуле:

$$APR = F1 \times 1 + F2 \times OR2 + F3 \times OR3$$

По определению средний популяционный риск больше 1, если мутантный аллель является аллелем риска, и меньше 1, если мутантный аллель протективен (снижает риск развития инсульта).

Относительный риск каждого из трех генотипов по отдельному SNP вычисляется по формулам:

$$RR1 = 1/APR$$

$$RR2 = OR2/APR$$

$$RR3 = OR3/APR$$

При таком определении величина относительного риска генотипа нормирована на средний популяционный риск по рассматриваемому SNP, иначе говоря, средняя величина относительного риска по каждому SNP в популяции равна 1.

Обобщенный относительный риск (GRR), обусловленный комбинацией аллелей, объединенных в группу, определяется в соответствии с мультипликативной моделью по формуле:

$$GRR_{\text{комбинации}} = RR_1 \times RR_2 \times RR_3 \dots \times RR_i,$$

где $RR_1 \dots RR_i$ – относительные риски по каждому из SNP, включенному в группу.

Обобщенный относительный риск также является нормированным показателем, то есть его величина более 1 соответствует значениям выше среднего обобщенного относительного риска в популяции, а величина менее 1 – соответственно значениям ниже среднего. При этом распределение значений обобщенного относительного риска в популяции определяется частотами встречаемости соответствующих генотипов в популяции.

Вычисление обобщенных относительных рисков проведено по мультипликативной модели, в то время как реальные закономерности накопления риска при наличии 2 и более формально независимых факторов риска (генетически не сцепленных SNP), неизвестно. Поэтому не следует полагать, что индивидуум с показателем GRR равным 5 имеют в пять раз более высокую вероятность развития инсульта, чем лица с $GRR=1$. Используя статистическую терминологию, можно сказать, что переменная GRR не описывается интервальной шкалой, но является порядковой или ранжируемой. Иными словами, значение $GRR=5$ больше, чем значение $GRR=2$, а $GRR=2$, в свою очередь, больше, чем значение $GRR=0.8$, но вопрос «во сколько раз больше?» не имеет смысла. Поэтому для каждой из двух групп факторов проводится разбиение всей области возможных значений GRR на 5 диапазонов (20 % перцентилей). Таким образом, в диапазон «низкого риска» попадает 20 % наименьших значений GRR, в диапазон «пониженного риска» – 20 % следующих по величине значений, и так далее. Внутри наивысшего 20 % перцентиля выделены диапазоны «высокого риска» (15 %) и «очень высокого риска» – 5 % наибольших значений. Границы диапазонов для двух групп генетических полиморфизмов – факторов риска – указаны в таблице 8.

**Границы диапазонов значений обобщенных
относительных рисков, отличающихся различной
степенью риска развития инсульта**

Группа генетических полиморфизмов – факторов риска	Диапазоны риска					
	Низкий риск	Пониженный риск	Средний риск	Повышенный риск	Высокий риск	Очень высокий риск
Инсульт-1	0.58– 0.70	0.70–0.78	0.78– 0.93	0.93–1.22	1.22– 1.83	>1.83
Артериальная гипертензия	0.18– 0.65	0.65–0.81	0.81– 0.99	0.99–1.27	1.27– 1.84	>1.84

Пример расчета генетического риска для пациента

1. По группе маркеров «Инсульт-1»

**1.1 Отношения шансов, частоты генотипов, относительный и
средний популяционный риск**

Средний популяционный риск (APR) для каждого маркера из группы «Ишемический инсульт-1» рассчитывается исходя из частот генотипов в европеоидных популяциях по данным HarMap-CEU и значений OR для этих генотипов.

Например:

$$APR_{rs1799983} = 1,00 \cdot 0,4 + 1,00 \cdot 0,517 + 1,14 \cdot 0,083 = 0,4 + 0,517 + 0,09462 = 1,012$$

Для каждого генотипа определен относительный риск (относительно среднего популяционного):

$$RR_{rs1799983} (GG) = 1/1,012 = 0,989$$

$$RR_{rs1799983} (GT) = 1/1,012 = 0,989$$

$$RR_{rs1799983} (TT) = 1,14/1,012 = 1,127$$

Аналогично проведен расчет для всех полиморфизмов, входящих в группу маркеров.

Все данные занесены в таблицу для дальнейшего расчета риска.

Таблица 9

**Отношения шансов, частоты генотипов, относительный
и средний популяционный риск для группы маркеров
«Инсульт-1»**

Генетический полиморфизм	Генотип	OR	Частота генотипа	RR	APR
rs1799983	GG	1,00	0,400	0,989	1,012
	GT	1,00	0,517	0,989	
	TT	1,14	0,083	1,127	
rs7193343	CC	1,00	0,690	0,932	1,073
	CT	1,22	0,292	1,137	
	TT	1,49	0,018	1,389	
rs556512	CC	1,00	0,496	0,977	1,024
	CT	1,04	0,416	1,016	
	TT	1,08	0,088	1,055	
rs4044210	TT	1,00	0,637	0,897	1,114
	TC	1,27	0,327	1,140	
	CC	1,77	0,035	1,589	
rs5998322	CC	1,00	0,900	0,912	1,097
	CT	1,97	0,100	1,796	
	TT	3,88	0,000	3,537	
rs12932445	TT	1,00	0,646	0,928	1,077
	CT	1,20	0,327	1,114	
	CC	1,44	0,027	1,337	
rs2200733	CC	1,00	0,788	0,884	1,131
	CT	1,54	0,195	1,362	
	TT	2,37	0,018	2,096	
rs702553	AA	1,00	0,470	0,960	1,042
	AT	1,03	0,430	0,989	
	TT	1,29	0,100	1,238	

1.2. Расчет генетического риска пациента

Таблица 10

**Генотип пациента по локусам, входящим в группу
«Инсульт-1»**

Генетический полиморфизм	rs1799983	rs7193343	rs556512	rs4044210	rs5998322	rs12932445	rs2200733	rs702553
Генотип	GT	CT	CC	TT	CC	TT	CC	AA
ОШ генотипа	1	1,22	1	1	1	1	1	1
Относительный риск	0,989	1,137	0,977	0,897	0,912	0,928	0,884	0,960

Обобщенный относительный риск (GRR), обусловленный комбинацией аллелей, объединенных в группу, определяется в

соответствии с мультипликативной моделью как произведение значений относительного риска каждого маркера:

$$GRR=0,989*1,137*0,977*0,897*0,912*0,928*0,884*0,960 = 0,708$$

Поскольку значение обобщенного относительного риска для пациента попадает в область больше 0,7 но меньше 0,78 (см. таблицу 8), то для него устанавливается пониженная степень риска по данной группе маркеров.

2 По группе маркеров «Артериальная гипертензия»

2.1 Отношения шансов, частоты генотипов, относительный и средний популяционный риск

По аналогии с первой группой проведен расчет Среднего популяционного риска (APR) для каждого маркера и Относительного риска (RR) всех генотипов с занесением в таблицу.

Таблица 11

Отношения шансов, частоты генотипов, относительный и средний популяционный риск для группы маркеров «Артериальная гипертензия»

Генетический полиморфизм	Генотип	OR	Частота генотипа	RR	APR
rs3918226	CC	1,00	0,833	0,907	1,102
	CT	1,34	0,133	1,216	
	TT	2,68	0,034	2,431	
rs11110912	CC	1,00	0,611	0,886	1,129
	CG	1,33	0,354	1,178	
	GG	1,34	0,035	1,187	
rs6997709	GG	1,00	0,540	1,102	0,908
	GT	0,83	0,372	0,914	
	TT	0,67	0,088	0,738	
rs2398162	AA	1,00	0,584	1,013	0,987
	AG	1,00	0,363	1,013	
	GG	0,76	0,053	0,770	
rs16998073	AA	1,00	0,673	0,962	1,039
	AT	1,10	0,269	1,059	
	TT	1,21	0,058	1,164	
rs1530440	CC	1,00	0,696	1,016	0,984
	CT	0,95	0,286	0,966	
	TT	0,90	0,018	0,915	
rs1378942	TT	1,00	0,487	0,939	1,065
	TG	1,10	0,389	1,033	
	GG	1,21	0,124	1,136	

Генетический полиморфизм	Генотип	OR	Частота генотипа	RR	APR
rs2820037	AA	1,00	0,688	0,865	1,156
	AT	1,50	0,250	1,298	
	TT	1,50	0,062	1,298	
rs17367504	AA	1,00	0,690	1,038	0,963
	AG	0,89	0,283	0,924	
	GG	0,79	0,027	0,820	
rs1937506	AA	1,00	0,053	1,430	0,700
	AG	0,75	0,416	1,072	
	GG	0,63	0,531	0,901	
rs7961152	CC	1,00	0,301	0,845	1,183
	CA	1,16	0,469	0,980	
	AA	1,47	0,230	1,242	

2.2. Расчет генетического риска пациента

Таблица 12

Генотип пациента по локусам, входящим в группу «Артериальная гипертензия»

Генетический полиморфизм	rs3918226	rs7961152	rs11110912	rs6997709	rs2398162	rs2820037	rs1937506	rs17367504
Генотип	CT	AA	CC	GG	AG	AA	GG	AA
ОШ генотипа	1,34	1,47	1	1	1	1	0,63	1
Относительный риск	1,216	1,242	0,886	1,102	1,013	0,865	0,901	1,038

Обобщенный относительный риск (GRR):

$$GRR = 1,216 * 1,242 * 0,886 * 1,102 * 1,013 * 0,865 * 0,901 * 1,038 * 1,059 * 1,016 * 1,033 = 1,343$$

Поскольку значение обобщенного относительного риска для пациента ВМЦ-1/Ки-1 попадает в область больше 1,27 но меньше 1,84 (см. табл. диапазонов групп риска), то для него устанавливается высокая степень риска по данной группе маркеров.

3. Оценка риска.

Таблица 13

Относительный генетический риск развития инсульта по двум группам маркеров для каждого пациента может быть представлен в таблице

Группа маркеров	Инсульт - 1		Артериальная гипертензия	
	Значение риска	Диапазон риска	Значение риска	Диапазон риска
GRR	0,708	Пониженный риск	1,342	Высокий риск

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Обратитесь к инструкции по применению



Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель



Беречь от влаги

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 35 лист 06

Директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

В.Г. Акимкин

