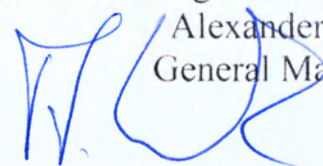


inno-train Niederhächsteler Str. 62 D-61476 Kronberg / Taunus Tel. +49-6173-607930 / Ф: -50	Инструкция по применению	
Версия 1.6	«HPA-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен)	CMK 07.20

Approved by
 inno-train Diagnostik GmbH
 Alexander Keck
 General Manager



Signature,
 Date,
 Seal

Инструкция по применению
 (Версия 2)

Набор реагентов «HPA-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) для типирования генов HPA, кодирующих поверхностные антигены тромбоцитов, методом аллель-специфической ПЦР по конечной точке на анализаторе «FluoVista» (ФлуоВиста)

Производство «инно-трейн Diagnostik GmbH», Германия

**Public Notary document register No. 114
 of the year 2022**

Public Notary David Jeitner
 with the seat in Frankfurt am Main
 Office: Berliner Straße 42a, D-60311 Frankfurt am Main

I hereby certify the above signature, confirmed in my presence, of

Mr. Alexander Keck,
 Managing Director, born 25.02.1966,
 official resident in Niederhöchstädter Straße 62, D-61476 Kronberg / Taunus,
 proven by German Identity Card.

It is stated that neither the Notary nor any member of her/his firm had acted in the matter which is the subject of this instrument, except in the notary capacity.

Frankfurt am Main, 23th of February 2022

David Jeitner
 Notary



Содержание

1.	Список сокращений и определений	3
2.	Наименование медицинского изделия и его назначение	3
3.	Область применения	4
4.	Специфическая патология, состояние или фактор риска, для обнаружения, определения или дифференцирования которого предназначено медицинское изделие для диагностики in vitro	4
5.	Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия	4
6.	Потенциальные пользователи Наборов	5
7.	Характеристики изделия	6
7.1.	Состав медицинского изделия, описание, назначение компонентов	6
7.2.	Описание принципов работы	8
8.	Дополнительные материалы (оборудование)	9
9.	Перечень применяемых производителем (изготовителем) медицинского изделия национальных стандартов	10
10.	Аналитические характеристики изделия	11
11.	Способ применения	11
11.1.	Информация о сборе образцов для исследования и их подготовке	11
11.2.	Создание задания в программе FluoGene	12
11.3.	ПЦР / Амплификация	12
11.3.1.	Термоциклирование	16
11.4.	Флуоресцентная детекция	16
11.5.	Расчёт данных	16
12.	Анализ данных	17
13.	Условия применения	19
14.	Хранение и срок службы	19
15.	Транспортировка	20
16.	Меры предосторожности при работе с Наборами	20
17.	Ограничения метода	22
18.	Объяснение символов	23
19.	Гарантийные обязательства	23
20.	Требования к техническому обслуживанию и ремонту медицинского изделия. Сервисное обслуживание	23
21.	Требования к охране окружающей среды. Порядок осуществления утилизации и уничтожения Наборов	23
22.	Информация о наличии в медицинском изделии лекарственного средства для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения	24
23.	Биологический референтный интервал применения медицинского изделия	24
24.	Информацию об интерферирующих веществах или ограничениях, связанных с пробой, которые могут повлиять на результат исследования	25
25.	Рекламация	26
26.	Информация об изготовителе и уполномоченном представителе	26
27.	Сведения о выпуске и пересмотре эксплуатационной документации	27
	Приложение А	28

1. Список сокращений и определений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и определения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
HPA	тромбоцитарные антигены человека, которые являются гликопротеинами мембраны тромбоцитов. В случае если у реципиента обнаруживаются антитела на тромбоцитарные антигены донора, запускается иммунная реакция, приводящая к лизису тромбоцитов из переливаемой крови
ССР (SSP)	Секвенспецифические праймеры
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
A260/280	Отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм
Taq-полимераза	Термостабильная ДНК-полимераза
Флуорохром	Флуоресцентный краситель
ДМСО	Диметилсульфоксид
Одно типирование	Исследование одного клинического образца для определения аллелей семи генов (HPA-1 a/b, HPA-2 a/b, HPA-3 a/b, HPA-4 a, HPA-5 a/b, HPA-6 a/b и HPA-15 a/b), которое проводится с использованием одного ряда из восьми лунок (A – H) на ПЦР-планшете

2. Наименование медицинского изделия и его назначение

Наименование медицинского изделия:

«Набор реагентов «HPA-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) для типирования генов HPA, кодирующих поверхностные антигены тромбоцитов, методом аллель-специфической ПЦР по конечной точке на анализаторе «FluoVista» (ФлуоВиста)» (далее по тексту – *Наборы реагентов HPA-FluoGene (ХПА-ФлуоГен), Наборы HPA, Наборы. Набор*).

Назначение медицинского изделия:

Изделие предназначено для качественного определения аллелей генов, кодирующих поверхностные антигены тромбоцитов человека (Human Platelet Antigens, HPA): HPA-1 a/b, HPA-2 a/b, HPA-3 a/b, HPA-4 a, HPA-5 a/b, HPA-6 a/b и HPA-15 a/b в клиническом образце в качестве вспомогательного средства диагностики

Определяемые изделием аллели представлены в таблице «Аллели, определяемые Набором реагентов «HPA-FluoGene».

Таблица - Аллели, определяемые Набором реагентов «HPA-FluoGene».

Реакция	HPA-1	HPA-2	HPA-3	HPA-4	HPA-5a	HPA-6b	HPA-9	HPA-15
Номер лунки	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2
Определяемые аллели	HPA-1a, HPA-1b	HPA-2a, HPA-2b	HPA-3a, HPA-3b	HPA-4a, HPA-4b	HPA-5a, HPA-5b	HPA-6a, HPA-6b	HPA-9a, HPA-9b	HPA-15a, HPA-15b
Название гена (по HGNC)	ITGB3	GP1BA	ITGA2B	ITGB3	ITGA2	ITGB3	ITGA2B	CD109
Однонуклеотидный полиморфизм	176 T>C	482 C>T	2621 T>G	506 G>A	1600 G>A	1544 G>A	2602 G>A	2108 C>A
Специфический маркер HPA (цвет)	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2

3. Область применения

Набор реагентов HPA-FluoGene (ХПА-ФлуоГен) применяется в клинико-лабораторной диагностике.

4. Специфическая патология, состояние или фактор риска, для обнаружения, определения или дифференцирования которого предназначено медицинское изделие для диагностики *in vitro*

Набор реагентов не выявляет специфическую патологию, состояние или фактор риска, а определяет состав индивидуальных антигенных характеристик лейкоцитов человека в соответствии с назначением Наборов реагентов HPA-FluoGene.

5. Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

Трансфузии тромбоцитов являются эффективным методом лечения многих заболеваний. Однако в некоторых случаях они не только не приводят к ожидаемому клиническому эффекту, но и сопровождаются осложнениями негемолитического типа. Тромбоциты являются носителями антигенов различных аллогенных систем. Наиболее значимыми являются антигены собственно тромбоцитарные, главного комплекса гистосовместимости, а также эритроцитов. На мембране тромбоцитов присутствуют антигены системы АВ0, Левис, I, i, P, но отсутствуют антигены систем Резус, Даффи, Келл, Кидд и Лютеран.

Тромбоцитам свойственно наличие своих собственных антигенов. Более 20 антигенов были описаны как тромбоцит-специфичные. Современные иммуногенетические методы позволили изучить молекулярную структуру как самой белковой молекулы, так и гена, кодирующего ее синтез. Гены системы HPA локализованы на длинном плече 5, 17 и 22-й хромосом. Наличие аллельных вариантов обусловлено единичным нуклеотидным полиморфизмом (заменой одного нуклеотида в аллель-специфичных участках). В 1990 г. была создана международная номенклатура тромбоцит-специфичных аллоантигенов – HPA (Human Platelet Antigens). Согласно этой номенклатуре каждый локус нумеруется последовательно с буквенным обозначением аллеля, один из которых («a») встречается значительно чаще второго («b»). В номенклатуру были включены только те антигены, к которым были выявлены антитела. Если антитела были выявлены только к одному аллелю, то к названию антигена добавляется «w» (HPA-10bw). К настоящему времени хорошо изучены гены 6 основных локусов (HPA1–5, 15) и несколько редко встречающихся генов, кодирующих продукцию антигенов.

Распределение HPA-генотипов

Применение молекулярно-генетических методов позволило изучить частоту аллелей среди различных расовых и этнических групп населения. В популяции белых европейцев частота аллелей большинства HPA- систем отклоняется в сторону «a» аллеля, а гомозиготы по «b» составляют около 0–15 %. Исследования частоты встречаемости аллоантигенов тромбоцитов в разных зарубежных популяциях указывают на значительные различия в распространенности этих антигенов среди жителей разных стран. Например, HPA-1 полиморфизм почти отсутствует в популяциях Дальнего Востока, в то время как HPA-4 полиморфизм практически отсутствует у белых европейцев, но присутствует в дальневосточной популяции. Данные о частоте встречаемости HPA в российской популяции ограничены единичными исследованиями. Полученные данные представлены в таблице ниже (данного раздела) в сравнении с данными европейской популяции, у доноров крови г. Санкт-Петербурга гены локусов HPA-1, 2, 3, 5 являются полиморфными, а гены

локуса HPA-4 не полиморфны. Поэтому, при подозрении на HPA аллоиммунизацию важно учитывать этническую принадлежность пациентов.

Таблица – Распределение HPA-генотипов среди белых европейцев и доноров г. Санкт-Петербурга

Генотип	Частота генотипов, %		
	J.G. McFarland, 1993	Bontadini et al., 2000	Собственные данные
HPA-1a/1a	72	78	74,7
HPA-1a/1b	26	16	21,9
HPA-1b/1b	2	6	3,4
HPA-2a/2a	85	76	83,3
HPA-2a/2b	14	22	15,5
HPA-2b/2b	1	2	1,7
HPA-3a/3a	37	53	38,35
HPA-3a/3b	48	38	50,7
HPA-3b/3b	15	9	14,95
HPA-4a/4a	99	нет данных	100
HPA-4a/4b	< 0,1	нет данных	0
HPA-4b/4b	< 0,1	нет данных	0
HPA-5a/5a	80	58,5	83,8
HPA-5a/5b	19	40	16,2
HPA-5b/5b	1	1,5	0

Используемые источники:

1. Н.В. Минеева, И.И. Кробинец, М.Н. Блинов, С.И. Капустин. Антигены и антитела к тромбоцитам (обзор литературы) // Онкогематология – 2013 - № 3 - С. 57-65.

6. Потенциальные пользователи Наборов

Потенциальными пользователями Наборов реагентов HPA-FluoGene являются специалисты с высшим и средним специальным образованием, прошедшие подготовку на лицензированных курсах специализации (повышения квалификации) по молекулярно-генетическим (ПЦР) методам диагностики.

7. Характеристики изделия

7.1. Состав медицинского изделия, описание, назначение компонентов

Состав Наборов реагентов «НРА-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) в вариантах исполнения:
 I. Набор реагентов «НРА-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) на 10 типирований; II. Набор реагентов «НРА-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) на 48 типирований представлен в Таблице № 1:

Таблица № 1 – Состав и описание Наборов реагентов «НРА-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен)

п/п	Наименование компонентов Набора НРА-FluoGene	Набор реагентов НРА-FluoGene вариант исполнения:		Описание	Состав
		на 10 типирований (кол-во шт.)	на 48 типирований (кол-во шт.)		
1.1	Белый 96-луночный ПЦР-планшет со штрих-кодом и маркированной покровной пленкой на одно типирование	10	-	Запечатанная 96-ти луночная панель со штрих-кодом и маркированная покровной пленкой	Смеси олигонуклеотидов, преаликвотированные и высушенные. Каждая из смесей содержит праймеры и зонды, маркированные различными флуоресцентным и метками: – Зонд, специфичный к НРА <i>a</i> (флуорохром 1 – DY495) Зонд, специфичный к НРА <i>b</i> (флуорохром 2 – DY530)
1.2	Белый 96-луночный ПЦР-планшет со штрих-кодом и маркированной покровной пленкой на шесть типирований	-	8	Запечатанная 96-ти луночная панель, содержащая комплементарные праймеры и зонды к системе генов НРА	Комплементарные праймеры и зонды к системе генов НРА
2	Пробирка со смесью FluoMix (ФлуоМикс)	10	48	Пластиковый контейнер цилиндрической формы с сужающимся дном	Смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, буфер для ПЦР и Taq-полимераза

3	Лист оптической пленки прозрачной	10	8	Оптически прозрачная клейкая пленка на белой глянцевой подложке.	-
4	Инструкция по применению набора «НРА-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен)	1	-	-	-
5	Документация к набору и номеру партии				
-	Сертификат качества	1	-	-	-
-	Таблица специфичности	1	-	-	-
-	Информационный лист с изменениями по сравнению с предыдущим лотом (партией)	1 шт. (при наличии изменений)	-	-	-
6	Компакт-диск, содержащий файлы, дополняющие базу данных лотов (партий) и аллелей используемых наборов, для импорта в программное обеспечение FluoGene (ФлуоГен), и инструкцию по импорту файлов с компакт-диска в ПО FluoGene (ФлуоГен)	1	-	-	-

Набор реагентов «НРА-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) совместим с Анализатором флуоресцентным «FluoVista» (ФлуоВиста) (РУ _____ от _____) производства inno-train.

Каждое типирование (исследование) одного пациента с использованием Наборов реагентов «НРА-FluoGene» в вариантах исполнения на 10 и 48 типирований включает 9 (девять) специфических реакций ПЦР (включая контроль). Количество реакций постоянно во всех наборах НРА.

Белый 96-луночный ПЦР-планшет со штрих-кодом и маркированной покровной пленкой на одно типирование рассчитан на исследование 1 (одного) пациента в варианте исполнения Наборов реагентов НРА на 10 типирований.

Белый 96-луночный ПЦР-планшет со штрих-кодом и маркированной покровной пленкой на шесть типирований рассчитан на исследование 6 (шести) пациентов в варианте исполнения Наборов реагентов НРА на 48 типирований.

Одна пробирка со смесью FluoMix (ФлуоМикс) предназначена для одного типирования.

Компакт-диск содержит информацию, дополняющую базу данных лотов (партий) и аллелей используемых наборов, для импорта в программное обеспечение FluoGene (ФлуоГен), и инструкцию по импорту файлов с компакт-диска в ПО FluoGene (ФлуоГен):

- Файлы для идентификации планшетов по штрих-кодам, содержащие следующие данные: вид теста, количество пациентов, срок годности и индивидуальный номер планшета (не более 48 файлов);

- Файлы, содержащие информацию о нулевой линии, которая соответствует пороговому значению (Cut-Off) уровня флуоресценции раствора применительно к лоту (партии)

используемых наборов для проведения анализа исследуемых образцов. (не более 5ти файлов);

– Файлы, содержащие информацию для обновления базы данных аллелей используемых наборов (не более 30ти файлов);

– Инструкция по импорту файлов с компакт-диска, в программное обеспечение FluoGene (ФлуоГен) – 1 шт.

Назначение компонентов Наборов Реагентов НРА:

1. Белый 96-луночный ПЦР-планшет со штрих-кодом и маркированной покровной пленкой на одно или шесть типирований (НРА-FluoGene) предназначен для проведения исследований семи человеческих тромбоцитарных генов (НРА-FluoGene).
2. Пробирка со смесью FluoMix (ФлуоМикс) предназначена для проведения ПЦР.
3. Лист пленки оптической прозрачной предназначен для запечатывания ПЦР-планшета. Пленка для ПЦР и других флуоресцентных анализов, без растворителей (ДМСО, ацетонитрил, метанол), без РНКаз/ДНКаз.
4. Инструкция по применению наборов «НРА-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) предназначена для пошагового описания применения наборов реагентов «НРА-FluoGene» в вариантах исполнения на 10 и 48 типирований.
5. Сертификат качества предназначен для подтверждения качества наборов реагентов «НРА-FluoGene» в вариантах исполнения на 10 и 48 типирований.
6. Таблица специфичности предназначена для получения информации о том: в какой лунке в планшете какие аллели детектируются, а также указаны нуклеотидные замены, которые детектируются в каждом случае при нуклеотидном полиморфизме. Таблица специфичности носит информативный характер.
7. Информационный лист с изменениями по сравнению с предыдущим лотом (партией) предназначен для отображения отличий лотов (партий). Информационный лист прикладывается к документации к Наборам только в случае наличия изменений в лотах (партиях) Наборов.
8. Компакт-диск предназначен для обновления базы данных по лотам (партиям) и аллелям используемых наборов, для импорта в программное обеспечение FluoGene (ФлуоГен), и для информирования пользователя о процедуре импорта файлов с компакт-диска в программное обеспечение FluoGene (ФлуоГен)

7.2. Описание принципов работы

Молекулярная система детекции SSP компании inno-train основана на методе полимеразной цепной реакции, которая позволяет проводить амплификацию определенных последовательностей ДНК. После проведения амплификации, последовательность целевого участка геномной ДНК накапливается в достаточной концентрации для анализа. В Наборе реагентов НРА-FluoGene используются специфические олигонуклеотидные зонды, позволяющие различать аллели НРА а и b, в то время как связывание праймеров происходит аллель-неспецифично. Образцы, в которых праймеры и зонды гибридизуются с целевыми специфическими последовательностями ДНК, содержат специфический ПЦР-продукт после проведения ПЦР. Образцы, в которых не происходит специфического связывания праймеров и зондов с целевыми последовательностями ДНК, специфического ПЦР-продукта после проведения ПЦР не содержат.

Детекция ПЦР-продуктов осуществляется путем измерения флуоресценции, а не посредством гель-электрофореза как в обычных тест-системах, основанных на методе ПЦР. В каждой реакции используются два флуорохрома, различающиеся по спектрам эмиссии флуоресценции, которые находятся на олигонуклеотидных зондах. Один из зондов специфичен к последовательности аллели НРА а, а другой к последовательности НРА b. Детекция флуоресценции осуществляется по конечной точке при помощи флуориметра (анализатор FluoVista производства inno-train). При определении прохождения реакции ПЦР по конечной точке детекция эмиссии флуоресценции осуществляется до (предварительное считывание) и после проведения реакции ПЦР (детекция конечных

продуктов амплификации), после чего рассчитывается разница между этими значениями при помощи программного обеспечения FluoGene, которое предустановлено на персональный компьютер, входящий в базовый состав Анализатора FluoVista (ФлуoВиста).

Гены НРА-системы (НРА-1, НРА-2, НРА-3, НРА-4, НРА-5, НРА-6, НРА-9 и НРА-15) являются биаллельными с двумя аллельными вариантами, известными как *a* и *b*. Эти аллели различаются однонуклеотидными заменами, которые приводят к одиночным аминокислотным заменам в белке. Наборы НРА-FluoGene производства inno-train позволяет различать эти однонуклеотидные полиморфизмы. Каждая из олигонуклеотидных смесей содержит праймеры и зонды, меченные различными флуоресцентными красителями:

- Зонд, специфичный к НРА *a* (флуорохром 1);
- Зонд, специфичный к НРА *b* (флуорохром 2).

Расположение отрицательного контроля (контроля на контаминацию), отмечено на планшете черной линией.

Целевым анализом для набора «НРА-FluoGene» являются: гены, нуклеиновые кислоты, нуклеотиды и их последовательности.

Метод анализа – качественный.

8. Дополнительные материалы (оборудование)

Таблица № 2. Дополнительные материалы (изделия), необходимые для работы с наборами реагентов НРА-FluoGene

п/п	Наименование дополнительных материалов (изделий)	Примечание
1.	Для амплификации:	
1.1	Вода для ПЦР	Основные параметры: Стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз, с удельным сопротивлением 16-18 Мом*см, предназначенная для работы с нуклеиновыми кислотами
1.2	Наконечники для пипеток	Наконечники для автоматических и полуавтоматических лабораторных пипеток в штативах. Сертифицированные на отсутствие ДНКаз, РНКаз, человеческой ДНК и ингибиторов ПЦР. Гидрофобные, химически инертные, обладающие низкой сорбцией дозируемых веществ. Объемы до 10мкл, до 20мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.
1.3	Образец ДНК для типирования	Выделенная ДНК человека, с показателем чистоты образца A260/A280 (оптической плотности при длине волн 260/280) равным 1,8 (± 0,18).
1.4	Пипетка лабораторная объёмом от 2 до 20 мкл	Основные параметры: Высокоточные автоматические и полуавтоматические лабораторные пипетки объёмом от 2 до 20 мкл. Химическая и УФ-устойчивость корпуса пипетки.
1.5	Пипетка лабораторная объёмом от 100 до 1000 мкл	Основные параметры: Высокоточные автоматические и полуавтоматические лабораторные пипетки объёмом от 100 до 1000 мкл. Химическая и УФ-устойчивость корпуса пипетки.
1.6	Термоциклер (амплификатор)	Термоциклер для амплификации нуклеиновых

		кислот T100 (T100 Thermal Cycler), «Био-Пад Лабораториесз, Инк.», США, РУ № ФСЗ 2012/12788 от 21.06.2016
1.7	Прижимная прокладка «FluoPad» (ФлюоПад)	Прижимная прокладка «FluoPad» (ФлюоПад), артикул № 002 07C P01, производство inno-train
1.8	Аппликатор «FluoApp» (ФлюоАпп)	Аппликатор «FluoApp» (ФлюоАпп), артикул №002 07FA01, производство inno-train.
1.9	Набор для экстракции нуклеиновых кислот	Наборы реагентов для типирования генов главного комплекса гистосовместимости человека in vitro: 3. Выделение и очистка ДНК (DNA Extraction and Purification): ПРОТРАНС ДНК Box 500 (PROTRANS DNA Box 500), производства «ПРОТРАНС медицинше диагностише Продакте ГмбХ», Германия, РУ № ФСЗ 2009/03600 от 26.01.2009
1.10	Анализатор определения концентрации выделенной ДНК	Используйте любой доступный на рынке и анализатор, зарегистрированный в установленном порядке на территории РФ.
1.11	Набор для измерения концентрации выделенной ДНК	Используйте любой доступный на рынке набор, зарегистрированный в установленном порядке на территории РФ.
2	Для детекции и оценки результатов:	
2.1	Анализатор «FluoVista» (ФлюоВиста)	Анализатор FluoVista флуориметрический (артикул № 006 010 000) производства компании inno-train Diagnostik GmbH/ инно-трейн Diagnostik ГмбХ

Дополнительные материалы (изделия), необходимые для работы с Наборами реагентов HPA-FluoGene, не входят в комплект поставки наборов и приобретаются пользователем отдельно.

9. Перечень применяемых производителем (изготовителем) медицинского изделия национальных стандартов

Наборы реагентов HPA-FluoGene (ХПА-ФлюоГен), а также техническая и эксплуатационная документация к ним, соответствует национальным стандартам РФ на продукцию:

- ГОСТ Р ЕН 13612–2010 «Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro»;
- ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения»;
- ГОСТ Р ИСО 18113-1–2015 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования»;
- ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro»;
- ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования»;
- ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

10. Аналитические характеристики изделия

Таблица № 2.1 – Аналитические характеристики Наборов HPA-FluoGene.

Вид биологического материала для исследований	Цельная кровь
Аналитическая специфичность	При исследовании влияния интерферирующих веществ: гемоглобин (в концентрации 2000 мг/дл), билирубин (в концентрации 20 г/л), липопротеиды (в концентрации 37 ммоль/л), - на проведение типирования, выполненного при помощи наборов HPA-FluoGene, интерференции не выявлено.
Аналитическая чувствительность (предел детекции)	Рекомендованная концентрация ДНК для наборов реагентов HPA-FluoGene. - 1 нг/мкл.
Чувствительность и специфичность	99,74% В исследовании было сопоставлено 48 образцов, типированных для HPA с помощью HPA-FluoGene в сравнении с HPA-ReadyGene. Все результаты типирования на 99,74% согласуются с результатами предварительного типирования с помощью систем типирования SSP ПЦР, маркированных CE
Воспроизводимость и повторяемость	100% Наборы реагентов HPA-FluoGene дают одинаковые результаты при повторном типировании и показывают сопоставимые коэффициенты значений сигналов флуоресценции
Внешняя валидация рабочих показателей (клинические исследования)	Исследование было проведено для демонстрации того, что наборы HPA-FluoGene могут использоваться по назначению. Цель заключалась в демонстрации того, что типирование является допустимым и надежным. В итоге валидация рабочих показателей продемонстрировала, что наборы HPA-FluoGene дают допустимые результаты типирования. Было успешно продемонстрировано, что наборы HPA-FluoGene дают истинные и воспроизводимые результаты, сопоставимые с результатами эталонных систем. Диагностическая чувствительность: все результаты типирования на 100% совпадали с системами типирования ПЦР-ССП с маркировкой CE. Диагностическая специфичность: все результаты типирования на 100% совпадали с системами типирования ПЦР-ССП с маркировкой CE.

11. Способ применения

Способ применения Наборов HPA приведен ниже.

11.1. Информация о сборе образцов для исследования и их подготовке

Тип анализируемого образца: цельная венозная кровь. Забор крови осуществляется путем венепункции в вакуумные пробирки, содержащие антикоагулянт (цитрат натрия, K2-ЭДТА или K3-ЭДТА).

В качестве антикоагулянта для получения образцов крови должны использоваться K2-ЭДТА, K3-ЭДТА или цитрат натрия так как оставшийся, после выделения ДНК, гепарин может ингибировать реакцию ПЦР. При экстрагировании ДНК из крови в качестве источника ДНК используются лейкоциты. Перед началом теста необходимо определить концентрацию образца ДНК.

Для экстракции нуклеиновых кислот используйте Наборы реагентов для типирования генов главного комплекса гистосовместимости человека *in vitro*: 3. Выделение и очистка

ДНК (DNA Extraction and Purification): ПРОТРАНС ДНК Box 500 (PROTRANS DNA Box 500)», производства «ПРОТРАНС медицинше диагностише Продакте ГмбХ», Германия, РУ № ФСЗ 2009/03600 от 26.01.2009 г.

Образец ДНК разбавляется водой для ПЦР (без флуоресценции) до концентрации около 1 нг/мкл. Или же неразведенная ДНК может быть смешана со смесью FluoMix (Пробирка со смесью FluoMix (ФлуоМикс), входящая в состав набора реагентов «НРА-FluoGene») и разбавлена водой до конечной концентрации 0,5 нг/мкл. Соотношение оптического поглощения, характеризующее чистоту образца – A260/280 должно быть 1,8 ± 0,18.

Допускается хранить исследуемые образцы цельной крови при температуре от 2°C до 8°C не более 24 часов после забора крови.

11.2. Создание задания в программе FluoGene

Для регистрации Белых 96-луночных ПЦР-планшет со штрих-кодом и маркированной покровной пленкой (далее по тексту – ПЦР-планшетов FluoGene) и тестирования образцов ДНК в программе FluoGene (ФлуоГен) должно быть создано задание в соответствии с инструкцией по использованию программного обеспечения FluoGene. Программа FluoGene автоматически создает протокол ПЦР, что является нормативом для подготовки ПЦР в тест-системе (наборах реагентов).

11.3. ПЦР / Амплификация

Схематично проведение теста приведено ниже (см. Рис. 1)

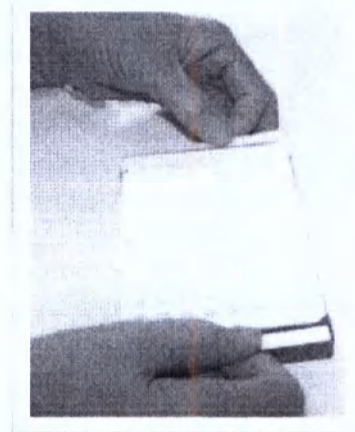


Рис. 1 – схема проведения исследования с помощью наборов НРА-FluoGene.

Для удобства описания работы с белым 96-луночным ПЦР-планшетом со штрих-кодом и маркированной покровной пленкой на одно или шесть типирований (далее по

тексту — ПЦР-планшет) ниже на рисунках 2А, 2В. приведено его схематичное изображение с нумерацией лунок.

Для проведения типирования на одного пациента используются восемь лунок. Каждая лунка отвечает за типирование по одному гену. (HРА-1, HРА-2, HРА-3 и тд.) Гены HРА являются биаллельными, то есть каждый ген имеет в своем составе две аллели а и/или b. Таким образом, у одного гена могут быть три аллельных варианта: aa, ab или bb. Исходя из этого, в каждой лунке находятся две смеси праймеров и зондов. Одна смесь комплиментарна аллели а, вторая смесь комплиментарна аллели b. Так как гены биаллельны, то в любом случае хотя бы одна реакция в лунке должна быть положительна. Поэтому в этом случае контроль расщепывания не требуется. Значит, в этих лунках отсутствует праймер и зонд комплиментарный гену роста человека.

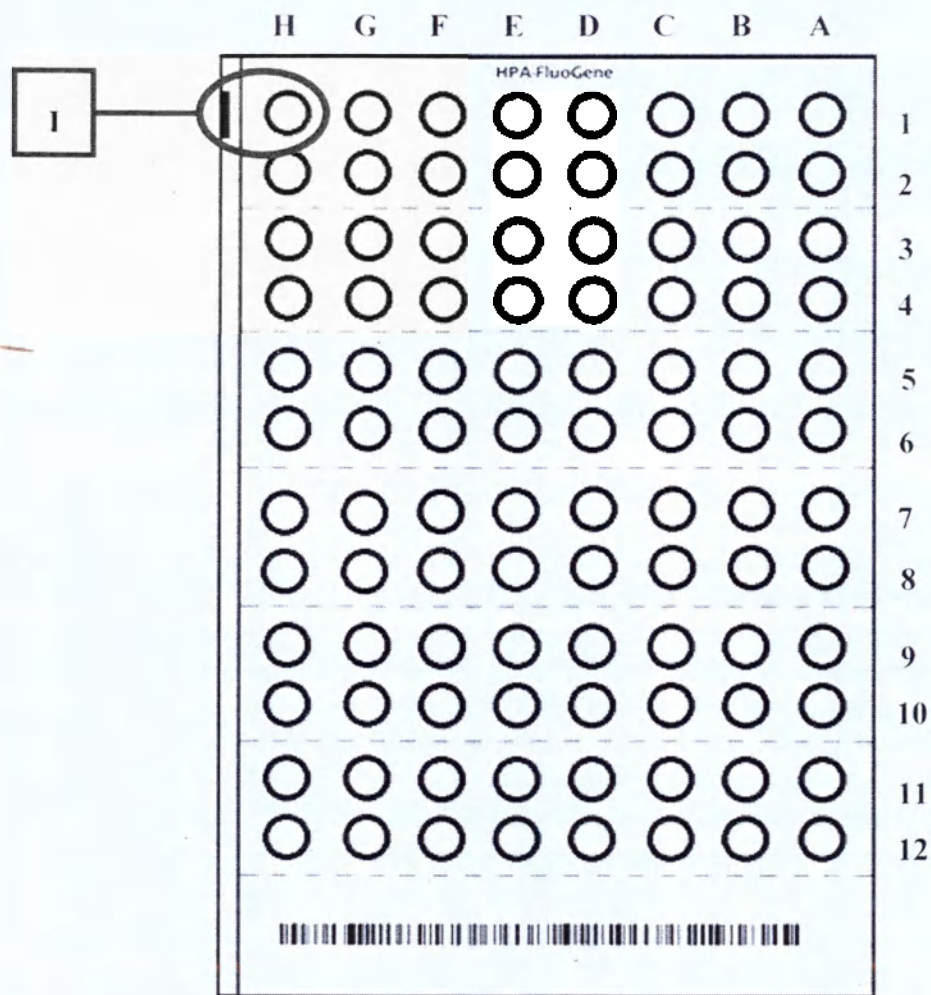


Рис. 2.А – Схематичное отображение лунок ПЦР-планшета на одно типирование для набора реагентов «HPA-FluoGene» на 10 типирований

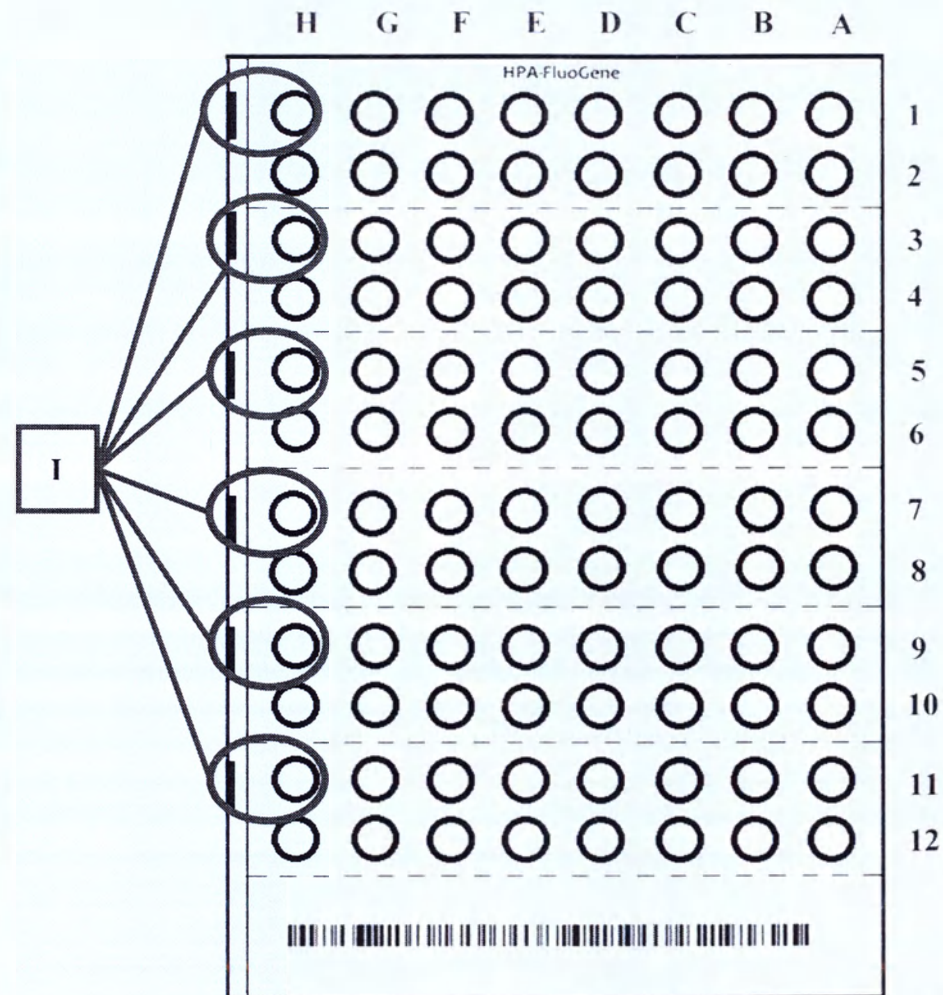


Рис. 2.В – Схематичное отображение лунок ПЦР-планшета на шесть типирований для набора реагентов «HPA-FluoGene» на 48 типирований

Где **I** – отрицательный контроль/контроль на контаминации в лунках ПЦР-планшета.

Процедура проведения ПЦР-исследования (аналогична для всех наборов HPA-FluoGene):

1. Разморозьте белый 96-луночный ПЦР-планшет со штрих-кодом и маркированной покровной пленкой, готовую пробирку со смесью FluoMix для ПЦР и образцы ДНК пациента. Отрицательный контроль/контроль контаминации находится в лунках, отмеченных черным цветом (отмечен цифрой **I** на Рисунках 2.А и 2.В);
2. Одно типирование HPA состоит из одной реакции отрицательного контроля (позиция H1 на Рис. 2А) и 8 специфических реакций HPA (колонка 2 согласно Рис. 2.А). Набор реагентов «HPA-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) на 10 типирований содержит 10 планшетов по одному типированию на одного пациента, включающее в себя 8 специфических реакций. Контроль контаминации расположен в положении H1. Соответственно, 8 специфических реакций находятся в колонке 2.
3. Одно типирование HPA состоит из одной реакции отрицательного контроля (позиция H1, см. Рис. 2В) и 8 специфических реакций HPA (колонка 2 согласно Рис. 2.В). Набор реагентов «HPA-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) на 48 типирований содержит 8 планшетов. Каждый планшет рассчитан на типирование шести пациентов. Каждое типирование включает в себя 8 специфических реакций. Контроли контаминации расположены в положении H1, H3, H5, H7, H9 и H11. Соответственно, 8 специфических реакций находятся в колонках 2, 4, 6, 8, 10 и 12.
4. Пробирка со смесью FluoMix (ФлуоМикс) готова к использованию и каждая пробирка рассчитана на одно типирование, включающее в себя 8 реакций. Перед добавлением ДНК, тщательно перемешайте Смесь FluoMix путем встряхивания пробирки, либо с помощью лабораторного смесителя (например, Vortex), – по усмотрению пользователя, и лабораторной пипеткой перенесите 7,5 мкл смеси FluoMix в лунку отрицательного контроля
5. Добавьте 7,5 мкл воды для ПЦР в лунку с отрицательным контролем
6. После этого добавьте ДНК разбавленную водой для ПЦР (в соответствии с Таблицей 2), (концентрация 1 нг/мкл) к оставшейся смеси FluoMix (в соответствии с Таблицей № 3), снова тщательно перемешайте путем встряхивания, либо с помощью лабораторного смесителя (например, Vortex) -по усмотрению пользователя, и внесите аликвоты по 15 мкл в оставшиеся лунки (колонка 2 на Рис. 2.А или колонки 2/4/6/8/10/12 Рис. 2.В) для реакций типирования (предпочтительно это делать с помощью пипетки лабораторной, помещая каплю у верхнего края стенок лунки)

В альтернативном варианте можно добавить неразбавленную ДНК непосредственно в Пробирку со смесью FluoMix и разбавить водой для ПЦР (в соответствии с Таблицей 2) до конечной концентрации. Требуемые конечные объем смеси FluoMix и концентрация ДНК в реакциях указаны в Таблице № 3 ниже.

Таблица № 3. Конечный объем смеси FluoMix и концентрация ДНК необходимые для проведения реакций

Наименование наборов	Объем смеси FluoMix	Объем образца ДНК на одно типирование	Конечный объем смеси FluoMix, H ₂ O и ДНК
1	2	3	4
Набор HPA-FluoGene	90 мкл	90 мкл *	180 мкл

*- объем образца ДНК на одно типирование составляет 90 мкл = X мкл ДНК + Y мкл H₂O, где:

X - объем образца ДНК на одно типирование в концентрации 1 нг/мкл,

Y - объем воды для ПЦР (в соответствии с Таблицей 2), необходимой для конечной концентрации ДНК на одно типирование (концентрации 1 нг/мкл).

Для лучшей видимости, лунки, в которые была внесена смесь приобретают слабую окраску (контроль контаминации приобретает красноватый цвет, а специфические реакции приобретают голубоватый цвет).

7. Запечататайте ПЦР-планшет самоклеящимся Листом пленки оптической прозрачной и плотно прижмите (используйте одноразовые лабораторные перчатки и аппликатор FluoApp от inno-train). Не допускайте появления отпечатков пальцев и загрязнения листа пленки оптической прозрачной.
8. Аккуратно постучите ПЦР-планшетом по рабочей поверхности стола, чтобы вся жидкость оказалась на дне реакционных лунок, либо отцентрифугируйте ПЦР-планшет в центрифуге в течение короткого промежутка времени (10-15 сек.), (по усмотрению пользователя).
9. Не допускайте попадание капель жидкости и образование конденсата на листе пленки оптической прозрачной на протяжении всей процедуры. При необходимости, перенесите ПЦР-планшет в термоциклер (амплификатор) и инкубируйте около 30 секунд при прогретой крышке.
10. Предварительные показания должны быть получены не позднее 15 минут после внесения всех реагентов в лунки ПЦР планшета. Поместите ПЦР-планшет в анализатор FluoVista производства inno-train и проведите измерение до проведения процедуры термоциклирования ПЦР-планшета. Обратите внимание, что для правильной установки ПЦР-планшета на поддоне анализатора FluoVista предусмотрены специальные металлические болты. Если планшет установлен правильно (неровным краем с правой стороны), планшет автоматически входит в устройство.
11. Перенесите ПЦР-планшет в термоциклер (амплификатор), накройте ПЦР-планшет – прижимной прокладкой FluoPad «ФлуоПад» от inno-train, убедившись, что прогреваемая крышка термоциклера чистая и запустите программу термоциклирования согласно Таблице № 4.

11.3.1. Термоциклирование

Таблица № 4. Программа термоциклирования.

1 x начальный цикл	40 x циклов	Охлаждение	
1	2	3	
95°C 2 мин.	95°C 15 сек.	20°C	20°C
	60°C 60 сек.	3 мин.	Макс. 15 мин

11.4. Флуоресцентная детекция

Флуоресцентная детекция по конечной точке (конечный продукт амплификации) производится на Анализаторе FluoVista от inno-train (считывание показаний после окончания реакции). Убедитесь, в отсутствии конденсата на листе пленки оптической прозрачной (см. выше п. 9 раздела 10.3). Показания должны быть сняты не позднее 15 минут после окончания термоциклирования.

11.5. Расчёт данных

Расчёт данных выполняется автоматически с помощью программного обеспечения «FluoGene» (ФлуоГен), предустановленного компанией inno-train на ПК.

12. Анализ данных

Анализ данных проводится после флуоресцентной детекции по конечной точке (выполнение считывания флуоресцентного сигнала до и после проведения ПЦР). При использовании метода детекции по конечной точке, фоновая флуоресценция флуорофоров, определяемая во время предварительного считывания показаний до начала ПЦР, автоматически вычитается программой «FluoGene» (ФлуоГен) из значений флуоресценции, полученных после проведения ПЦР.

Дополнительная информация представлена в инструкциях, входящих в комплект документации к Анализатору FluoVista (ФлуоВиста) флуориметрическому производства inno-train: руководство пользователя программного обеспечения «FluoGene» (ФлуоГен); руководство по эксплуатации системы «FluoVista» (ФлуоВиста); руководство пользователя программного обеспечения «Aspect FA» (Аспект ФА).

Ниже на рисунках 3, 4, 5 для наглядности приводим примеры (скриншоты с ПК) отображения ПЦР-планшетов в программном обеспечении FluoGene:

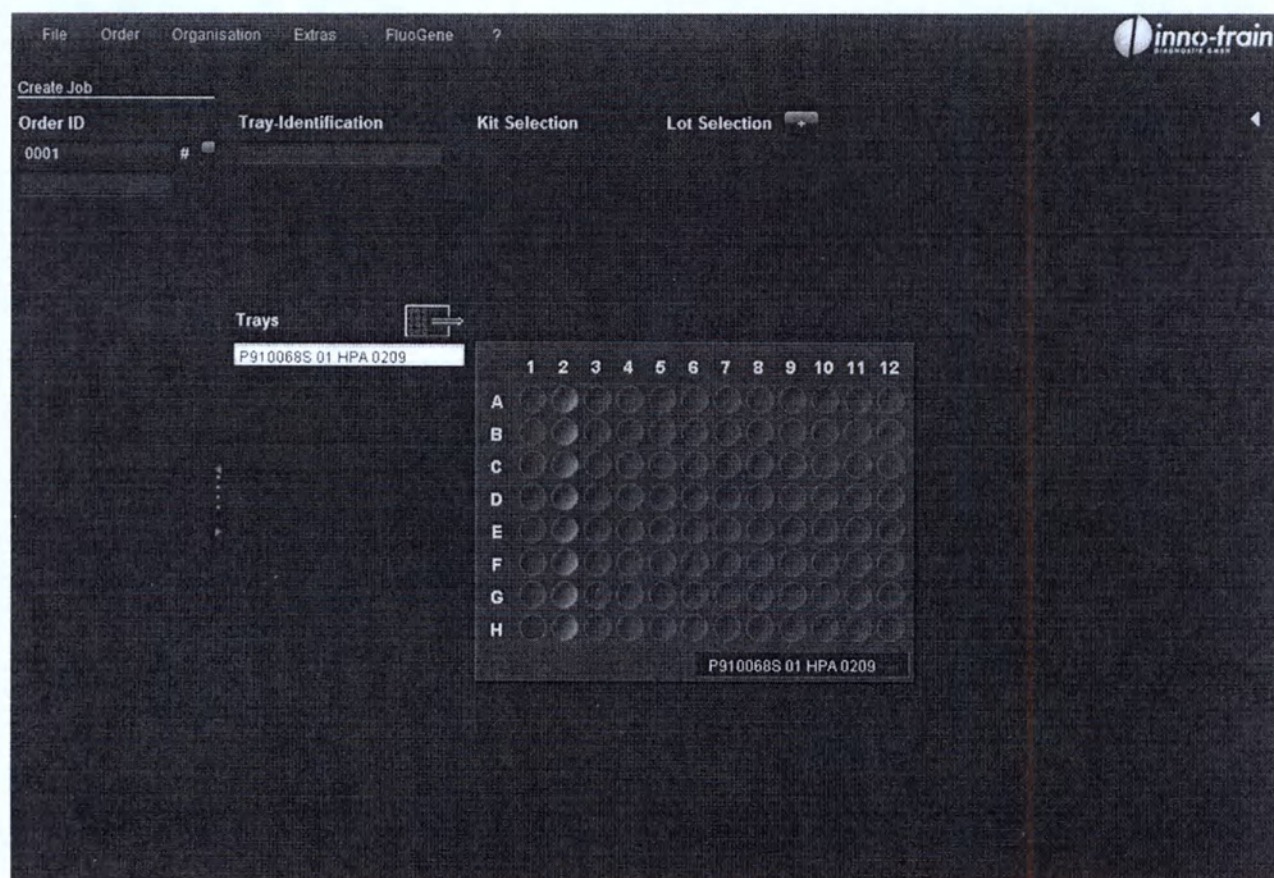


Рис. 3 – Раскапывание ПЦР-планшета для набора реагентов «HPA-FluoGene» на 10 типирований (на 1 пациента).

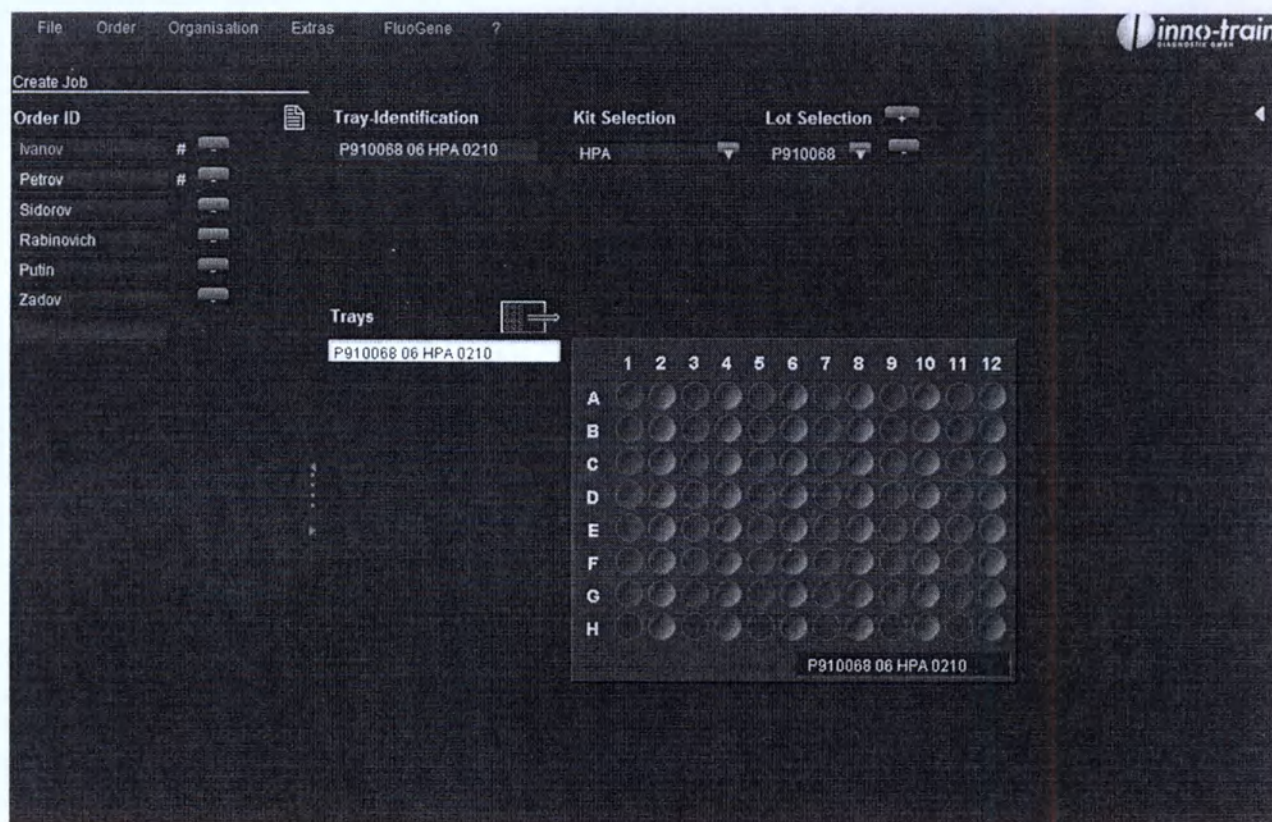


Рис. 4 – Раскапывание ПЦР-планшета для набора реагентов «HPA-FluoGene» на 48 типирований (на 6 пациентов).

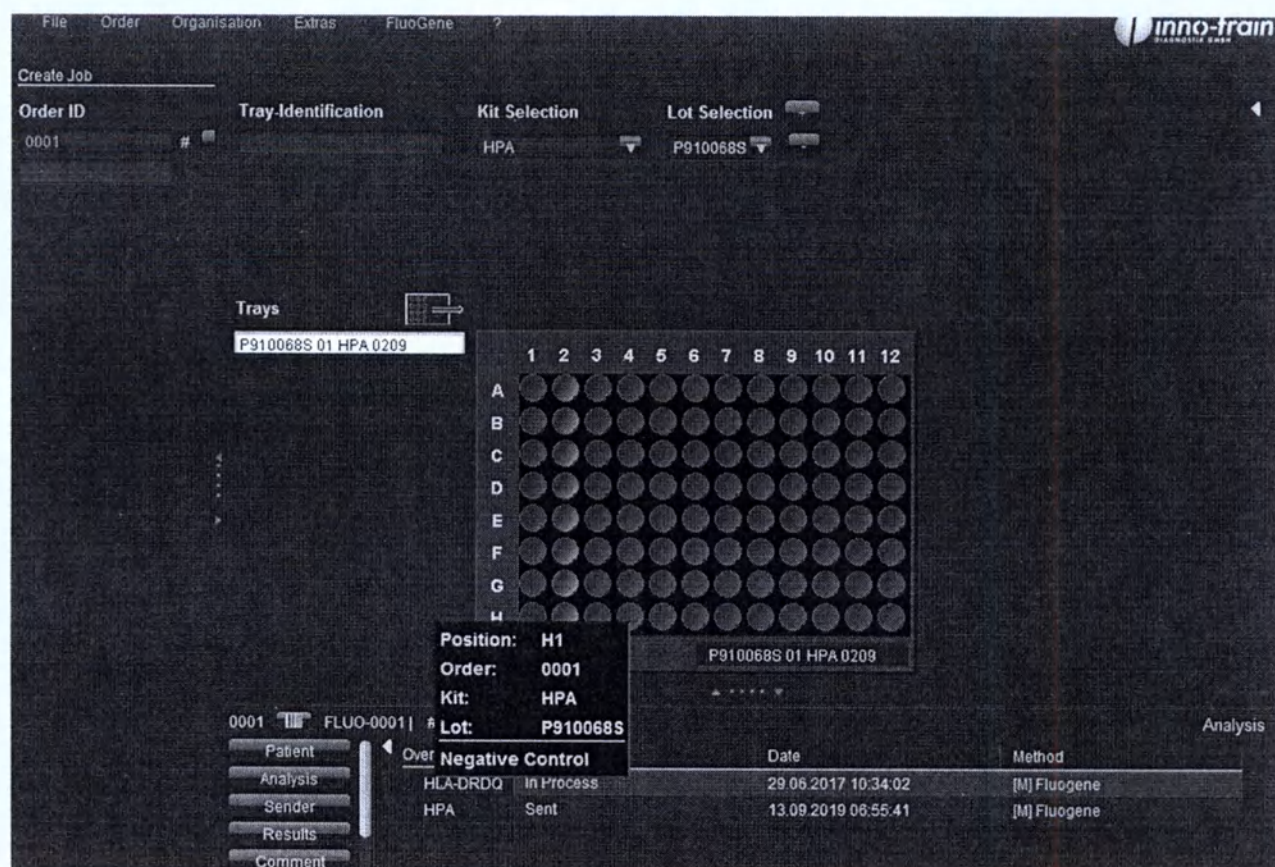


Рис. 5 – Отображение синей лунки в ПЦР-планшете на 10 типирований – отрицательный контроль/контроль контаминации.

Проведение подтверждающих тестов не требуется. Полученные результаты типирования пациентов считать достоверными.

Метод ПЦР SSP является окончательным и не требует подтверждения. В качестве альтернативного метода исследования можно использовать ПЦР в реальном времени (RealTime PCR) с использованием зарегистрированных в РФ тест-систем и анализаторов

13. Условия применения

Условия применения Наборов реагентов HPA-FluoGene (ХПА-ФлуоГен):

- температура окружающей среды от + 15°C до + 30°C;
- относительная влажность воздуха 10-80% (без конденсации).

Лист пленки оптической прозрачной, входящий в состав Наборов реагентов HPA-FluoGene (ХПА-ФлуоГен), имеет следующие показатели термоустойчивости (температурный диапазон): от -70 °C до 100 °C

14. Хранение и срок службы

Наборы HPA-FluoGene поставляются в охлажденном состоянии. После получения Наборов реагентов «HPA-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) хранятся у конечного потребителя при рекомендованной температуре хранения. Изделия однократного применения.

Температура хранения Наборов:

от -20°C и ниже (хранить в морозильной установке, обеспечивающей регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры).

Стабильность при хранении:

24 месяца Срок хранения каждого из компонентов набора указан на соответствующих этикетках. Не рекомендуется применение после окончания срока службы.

Вещество стабильно при соблюдении рекомендованных условий хранения. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

Сведения о стабильности после первого вскрытия внутренней упаковки:

не применимо, повторное замораживание после вскрытия внутренней упаковки не допускается.

Упаковочные материалы: используйте индивидуальную оригинальную упаковку, поставляемую производителем см. пункт «Упаковка».

Требования к складским помещениям для хранения Наборов:

Хранить наборы в оригинальной заводской упаковке при температуре от -20°C и ниже. Требования к положению Наборов HPA-FluoGene отсутствует, в виду того, что жидкое содержимое заморожено и компоненты Наборов надежно запечатаны производителем, в том числе пробирки снабжены закручивающимися крышками.

Рекомендации по организации хранилища для Наборов: хранить в сухом, хорошо проветриваемом помещении, не допускать контакта с сильными окислителями, смесями с присутствием перекиси водорода, перманганата калия, гипохлорита кальция и кислот.

Условия хранения Наборов после первого вскрытия внутренней упаковки: не применимо. Повторное использование после первого вскрытия недопустимо, в виду того, что планшет загружается в термоциклер полностью и подвергается воздействию высокой температуры, а одна пробирка со смесью FluoMix (ФлуоМикс) предназначена для выполнения одного анализа.

Температура при хранении смеси FluoMix (ФлуоМикс): от -20°C и ниже.

Стабильность при хранении смеси FluoMix (ФлуоМикс): 24 месяца.

15. Транспортировка

Транспортировка Наборов реагентов «НРА-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) должна проводиться только в оригинальной упаковке и только в охлажденном состоянии: в морозильной установке, обеспечивающей температуру окружающей среды: от -20°C и ниже.

допускается транспортировка Наборов с максимальной температурой окружающей среды не выше $+8^{\circ}\text{C}$ в течение не более 3-х суток, если Наборы FluoGene находятся в охлажденном состоянии в картонной коробке, содержащей термоконтейнер обеспечивающий необходимый диапазон температур, на дне /по бокам стенок которого лежат хладоэлементы. Температура внутри наборов не должна превышать 8°C в течение 72 часов.

16. Меры предосторожности при работе с Наборами

Благодаря закрытой конструкции Набора НРА-FluoGene риск загрязнения отсутствует, поскольку контакт врача с компонентами набора исключён.

Однако, при работе с кровью необходимо соблюдать осторожность, как с потенциальным источником инфекции, и пользоваться защитными перчатками, лабораторными халатами и иметь средства защиты для глаз (защитные пластиковые очки) в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Наборы реагентов «НРА-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) относятся к классу эпидемиологически опасных отходов (Класс Б) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

На основании действующих нормативов мы рекомендуем соблюдать следующие меры предосторожности во избежание контаминации при выполнении ПЦР:

- Пространственная изоляция зоны подготовки ПЦР – пре-ПЦР зоны (выделение и хранение ДНК, образцы ПЦР) от пост-ПЦР зоны, где происходит последующее проведение и обработка реакций (термоциклер, флуоресцентный спектрофотометр).
- Не допускается попадания компонентов из зоны пост-ПЦР в зону подготовки ПЦР.
- В зоне подготовки ПЦР используйте наконечники для пипеток с аэрозольной защитой при выполнении молекулярно-биологических работ при типировании групп крови.
- Необходим опыт работы в области молекулярно-генетического типирования и ДНК диагностики на основе ПЦР-реакций.
- Несоответствующий требованиям материал образцов может отрицательно сказаться на результатах анализа.
- Флуорофоры чувствительны к свету. Поэтому, все действия по подготовке Белых 96-луночных ПЦР-планшетов со штрих-кодом и маркированной покровной пленкой для анализа необходимо выполнять быстро.
- Нельзя использовать Наборы с истекшим сроком годности.
- Для герметизации планшетов FluoGene используйте только оптические пленки, входящие в состав Наборов.
- Для измерения флуоресценции используйте только Анализатор FluoVista производства компании inno-train
- Используемые Наборы реагентов НРА должны соответствовать лоту (партии) набора
- Необходимо строго соблюдать технические требования, перечисленные в инструкциях по использованию Наборов FluoGene. Любые отклонения от инструкции могут привести к появлению ложно-положительных или ложно-отрицательных результатов реакций и некорректным результатам типирования.

За более подробной информацией и консультацией обращайтесь к уполномоченному представителю производителя по телефону +7 (812) 777-06-05 или по адресу электронной почты info@nwcspsb.ru

Проблема	Возможная причина	Решение
Отсутствие реакции /Дожно-отрицательные результаты	Внесенный объем слишком велик	Проверьте настройки пипетки.
	Загрязненная ДНК	Измерьте оптическую плотность A260/280. Оптимальное значение 1,8 ($\pm 0,18$)
	Попадание магнитных частиц в ПЦР-реакцию	Отделите магнитные частицы с помощью магнита или центрифугирования.
	Наличие ПЦР-ингибиторов в дистиллированной воде	Используйте только специальную воду для ПЦР.
	Низкая концентрация ДНК	Измерьте концентрацию ДНК и при необходимости доведите ее до 1 нг/мкл. Для разведения ДНК использовать только воду без флуоресценции для ПЦР.
	Смесь FluoMix (ФлуоМикс) и раствор ДНК плохо перемешаны	Тщательно перемешайте смесь FluoMix(ФлуоМикс) с раствором ДНК.
	Реакционная смесь не была добавлена в лунку	Визуальный контроль. После добавления реакционной смеси раствор становится голубым.
	При добавлении реакционной смеси в лунку попали пузыри воздуха	Визуальный контроль. При наличии видимых пузырей отцентрифугируйте ПЦР-планшет в течение короткого промежутка времени или аккуратно постучите им по столу.
	Неправильные условия амплификации. Неисправен Термоциклер	Проверьте программу термоциклирования (См. пункт 11.3.1). Проверить Термоциклер (амплификатор) при необходимости – заменить.
	Лунки плохо запечатаны оптической пленкой	Убедитесь, что оптическая пленка плотно прилегает к каждой лунке. Для этой цели можно использовать Аппликатор «FluoApp» (ФлуоАпп). Во время ПЦР рекомендуется использовать Прижимную прокладку «FluoPad» (ФлуоПад)
	Брызги или грязь на оптической пленке	Смените Лист пленки оптической прозрачной
	Запотевание или загрязнение оптической пленки.	ПЦР-планшет выдержать в течение около 30 сек. в термоциклере с включенным подогревом крышки или заменить оптическую пленку. При работе с пленкой надевать чистые одноразовые перчатки. Убедитесь, что Анализатор «FluoVista» (ФлуоВиста) не находится в зоне прямого действия кондиционера
	Планшет неправильно закреплен на адаптерном планшете в ходе считывания показаний после окончания реакции	Проверьте правильность положения планшета перед каждым считыванием.
	Период между подготовкой ПЦР и предварительным считыванием показаний дольше, чем 15 минут и/или слишком длинный промежуток между окончанием ПЦР и детекцией флуоресценции	Снимите измерение с планшета не позднее, чем через 15 минут после подготовки ПЦР-реакций и всегда старайтесь держать планшет в темноте

	Внесенный объем слишком мал	Проверьте настройки пипетки
Ложно-положительные реакции	Внесенное количество ДНК слишком велико	Измерьте концентрацию ДНК и доведите ее до концентрации 1нг/мкл. Разводите ДНК только специальной водой для ПЦР.
	Неправильные условия амплификации	Проверьте программу термоциклирования (См. пункт 11.3.1)
	Неисправен Термоциклер	Проверить Термоциклер (амплификатор) при необходимости – заменить.
	Неправильные условия амплификации	
	Красный или желтый маркер был использован для нанесения надписей на планшет	Используйте только маркер черного или синего цвета для надписей на планшете.
	Наличие воздушных пузырей в лунке в ходе снятия предварительных показаний до ПЦР	Удалите возможные воздушные пузыри аккуратно постукав планшетом по столу или посредством центрифугирования.
	Испарение жидкости из-за плохого прилегания пленки.	Используйте Аппликатор «FluoApp» (ФлуоАпп) для тщательного запечатывания планшета. Позаботьтесь о том, чтобы по краям планшет был также плотно запечатан.
	Промежуток времени между концом ПЦР и детекцией флуоресценции слишком длинный.	Снимите показания с планшета не позднее чем 15 минут после окончания ПЦР.
	Брызги или грязь на оптической пленке.	Смените оптическую пленку.
	Запотевание или загрязнение оптической пленки.	Выдержать ПЦР-планшет в течение около 30 сек. в термоциклере с включенным подогревом крышки или заменить оптическую пленку. При работе с пленкой надевать чистые одноразовые перчатки. Убедитесь, что Анализатор FluoVista не находится в зоне прямого действия кондиционера
	Период между подготовкой ПЦР и предварительным считыванием показаний дольше, чем 15 минут.	Снимите измерение с планшета не позднее, чем через 15 минут после подготовки ПЦР-реакций.

17. Ограничения метода.

«Ограничения метода:

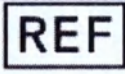
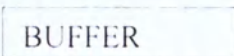
- Загрязнение ДНК ингибиторами ПЦР, такими как гемоглобин, гепарин, этанол, образцы, разделенные фиколлом (лейкоцитарная взвесь, клеточные суспензии) и т.д., может привести к серьезному вмешательству в реакцию ПЦР.
- Если пациент получает гепарин, используйте альтернативный источник ДНК (не цельную кровь).
- Избегайте использования липемичных или гемолизированных образцов, поскольку свободный гемоглобин может мешать реакции ПЦР.
- Использование образцов, собранных без антикоагулянта, или замороженных / размороженных несколько раз, не рекомендуется, поскольку эти условия могут не обеспечить достаточное количество или качество ДНК для типирования.»²

² - Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L and R. Johne R (2012), PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. J Appl Microbiol 2012 Nov;113(5):1014-26.

18. Объяснение символов

В данной инструкции по применению и в печатной продукции для Наборов НРА используются следующие предупредительные и информационные знаки:

Условные обозначения:

	Содержимого достаточно для выполнения (n) тестов		Дата окончания срока годности
	Номер лота		№ артикула
	Соблюдать инструкцию по применению		Производитель
	Соблюдать верхний температурный предел		In vitro диагностика
	Знак CE-mark: CE-маркировка		
	Белый 96-луночный ПЦР-планшет со штрих-кодом и маркированной покровной пленкой на одно или шесть типирований Пробирка со смесью FluoMix (ФлуоМикс)		
			
QMS XX.XX	Менеджмент контроля качества «месяц».год» (документ для внутреннего использования)		

19. Гарантийные обязательства

Набор реагентов «НРА-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) не подлежит ремонту и гарантийному обслуживанию.

20. Требования к техническому обслуживанию и ремонту медицинского изделия. Сервисное обслуживание

Не применимо.

21. Требования к охране окружающей среды. Порядок осуществления утилизации и уничтожения Наборов

Наборы реагентов «НРА-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) относится к классу эпидемиологически опасных отходов (Класс Б). Неиспользованные и использованные Наборы реагентов подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» для отходов класса Б.

Пользователь Наборов реагентов «HPA-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) несет обязанность по утилизации всех отходов (материалов проб), накапливающихся в результате работы с Наборами.

22. Информация о наличии в медицинском изделии лекарственного средства для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения

Изделие предназначено для диагностики *in vitro*, лекарственных средств для медицинского применения и человеческой предварительно типированной ДНК не содержит.

23. Биологический референтный интервал применения медицинского изделия

Таблица № 5. Распределение HPA-генотипов среди белых европейцев¹.

Генотип	Частота генотипов, %		
	J.G. McFarland, 1993	Bontadini et al., 2000	ФГБУ «НИИГиТ», г. Санкт-Петербург, 2013
HPA-1a/1a	72	78	74,7
HPA-1a/1b	26	16	21,9
HPA-1b/1b	2	6	3,4
HPA-2a/2a	85	76	83,3
HPA-2a/2b	14	22	15,5
HPA-2b/2b	1	2	1,7
HPA-3a/3a	37	53	38,35
HPA-3a/3b	48	38	50,7
HPA-3b/3b	15	9	14,95
HPA-4a/4a	99	нет данных	100
HPA-4a/4b	< 0,1	нет данных	0
HPA-4b/4b	< 0,1	нет данных	0
HPA-5a/5a	80	58,5	83,8
HPA-5a/5b	19	40	16,2
HPA-5b/5b	1	1,5	0

¹ - Н.В. Минеева, И.И. Кробинец, М.Н. Блиннов, С.И. Капустин Ст. «Антигены и антитела к тромбоцитам» Журнал «Онкогематология» №3 за 2013г. Стр.62.

24. Информацию об интерферирующих веществах или ограничениях, связанных с пробой, которые могут повлиять на результат исследования

Непригодными для исследования являются:

- образцы цельной венозной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- образцы цельной венозной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

Потенциально интерферирующие вещества:

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (цельная венозная кровь), используемом для исследования. Для проверки влияния эндогенных веществ были протестированы 3 образца ДНК выделенных из крови кадровых доноров с добавлением потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, превышающих верхнюю границу нормальной концентрации этих веществ в цельной венозной крови.

Свободный гемоглобин.

Это исследование было выполнено, чтобы проверить возможность влияния свободного гемоглобина на результаты типирования при помощи реагентов и тест-системы НРА-ФлуоГен. Из образцов цельной донорской крови выделяли лейкоцитарную ДНК и предварительно типировали при помощи наборов НРА-ФлуоГен.

Оценку влияния интерферирующего вещества (гемоглобин) проводили путем добавления к образцам цельной крови доноров контрольного раствора гемоглобина таким образом, чтобы конечная концентрация свободного гемоглобина в исследуемых образцах была равной 2000 мг/дл. Данная концентрация заведомо значительно превышает концентрацию гемоглобина, который может присутствовать в образце цельной человеческой крови. Далее из образцов цельной крови доноров снова выделяли геномную ДНК и проводили повторное типирование при помощи наборов НРА-ФлуоГен. Полученные результаты сравнивали с результатами предварительного типирования. Результаты исследования представлены в Таблице 10.

Билирубин

Это исследование было выполнено, чтобы проверить возможность влияния билирубина на результаты типирования при помощи реагентов и тест-системы НРА-ФлуоГен. Из образцов цельной донорской крови выделяли геномную ДНК и предварительно типировали при помощи наборов НРА-ФлуоГен.

Оценку влияния интерферирующего вещества (билирубин) проводили путем добавления к образцам цельной крови доноров контрольного раствора билирубина таким образом, чтобы конечная концентрация общего билирубина в исследуемых образцах была равной 20 г/л. Данная концентрация заведомо значительно превышает концентрацию билирубина, который может присутствовать в образце цельной человеческой крови. Далее из образцов цельной крови доноров снова выделяли лейкоцитарную ДНК и проводили повторное типирование при помощи наборов НРА-ФлуоГен. Полученные результаты сравнивали с результатами предварительного типирования. Результаты исследования представлены в Таблице 10.

Для проведения исследования влияния интерферирующих веществ на Наборы НРА-ФлуоГен образцы ДНК были типированы по соответствию аллелям различных групп крови человека. Результаты типирования сравнивали с результатами, полученными с помощью других коммерческих, маркированных знаком СЕ наборов для типирования с помощью SSP ПЦР. Исследование показало, что все результаты типирования с помощью наборов ФлуоГен полностью совпадали с результатами, полученными с помощью других наборов.

Липопротенды

Это исследование было выполнено, чтобы проверить возможность влияния с липопротендов на результаты типирования при помощи реагентов и тест-системы НРА-

ФлуоГен. Из образцов цельной донорской крови выделяли геномную ДНК и предварительно типировали при помощи наборов НРА-ФлуоГен.

Оценку влияния интерферирующего вещества (липопротеиды) проводили путем добавления к образцам цельной крови доноров контрольного раствора липопротеидов таким образом, чтобы конечная концентрация липопротеидов в исследуемых образцах была равной 37 ммоль/л. Данная концентрация заведомо значительно превышает концентрацию гемоглобина, который может присутствовать в образце цельной человеческой крови. Далее из образцов цельной крови доноров снова выделяли геномную ДНК и проводили повторное типирование при помощи наборов НРА-ФлуоГен. Полученные результаты сравнивали с результатами предварительного типирования. Результаты исследования представлены в Таблице 10.

Таблица № 6. Результаты исследования интерферирующих веществ.

Интерферирующее вещество	Концентрация	Наличие интерференции		
		Отсутствует	в	исследуемой
Свободный гемоглобин	2000 мг/дл	концентрации.		
Билирубин	20 г/л	концентрации.		
Липопротеиды	37 ммоль/л	концентрации.		

Таким образом, при исследовании влияния различных интерферирующих веществ на проведение исследований, выполненных при помощи наборов НРА-ФлуоГен, интерференции не выявлено.

25. Рекламация

По всем вопросам, касающимся эксплуатации, технического обслуживания, качества изделия на территории Российской Федерации следует обращаться в Общество с ограниченной ответственностью «Компания Северо-Запад», зарегистрированное по адресу: 195112, город Санкт-Петербург, проспект Новочеркасский, дом 1, литер Л, пом. № 4-Н комн. № 1,2,
Электронная почта: info@nwespb.ru

26. Информация об изготовителе и уполномоченном представителе

Разработчик:

inno-train Diagnostik GmbH, Niederhöchstädter Straße 62, 61476 Kronberg /Taunus, Germany / «инно-трейн Диагностик ГмбХ», Нидерхёхштедтер штрассе, 62, 61476 Кронберг/Таунус, Германия
Тел. + 49 6173-607930,
Факс. + 49 6173-607930,
Электронная почта: info@inno-train.de

Производитель

inno-train Diagnostik GmbH, Niederhöchstädter Straße 62, 61476 Kronberg /Taunus, Germany / «инно-трейн Диагностик ГмбХ», Нидерхёхштедтер штрассе, 62, 61476 Кронберг/Таунус, Германия
Тел. + 49 6173-607930,
Факс. + 49 6173-607930,

Электронная почта: info@inno-train.de

Адрес места производства

Niederhöchstädter Straße 62, 61476 Kronberg/Taunus, Germany /
Нидерхёхштедтер штрассе, 62, 61476 Кронберг/Таунус, Германия

Уполномоченный представитель производителя на территории РФ

Общество с ограниченной ответственностью «Компания Северо-Запад» (ООО «Компания Северо-Запад»)

195112, город Санкт-Петербург, проспект Новочеркасский, дом 1, литер Л, пом. № 4-Н комн. № 1.2,

Электронная почта: info@nwespb.ru

27. Сведения о выпуске и пересмотре эксплуатационной документации.

Последний пересмотр производителем эксплуатационной документации (инструкция по применению «НРА-FluoGene») до редакции 1.5 произошло в ноябре 2017 года.

Система менеджмента качества предприятия сертифицирована по EN ISO 13485-2016 (ISO 13485:2016)



Alexander Keck
General Manager

**Public Notary document register No. 115
of the year 2022**

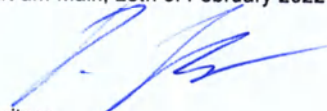
Public Notary David Jeitner
with the seat in Frankfurt am Main
Office: Berliner Straße 42a, D-60311 Frankfurt am Main

I hereby certify the above signature, confirmed in my presence, of

Mr. Alexander Keck,
Managing Director, born 25.02.1966,
official resident in Niederhöchstädter Straße 62, D-61476 Kronberg / Taunus,
proven by German Identity Card.

It is stated that neither the Notary nor any member of her/his firm had acted in the matter which is the subject of this instrument, except in the notary capacity.

Frankfurt am Main, 23th of February 2022



David Jeitner
Notary



Приложение А

К инструкции по применению медицинского изделия
«Набор реагентов «HPA-FluoGene» (ХПА-ФлуоГен) для типирования генов HPA,
кодирующих поверхностные антигены тромбоцитов, методом аллель-специфической ПЦР
по конечной точке на анализаторе «FluoVista» (ФлуоВиста)»

Информация для пользователей в России

Изделие предназначено для определения аллелей генов, кодирующих поверхностные антигены тромбоцитов человека (Human Platelet Antigens, HPA):

- HPA-1 a/b,
- HPA-2 a/b,
- HPA-3 a/b,
- HPA-4 a,
- HPA-5 a/b,
- HPA-6 a/b,
- HPA-15 a/b,

в клиническом образце в качестве вспомогательного средства диагностики

Если по результатам исследования клинического образца с помощью Набора реагентов HPA-FluoGene (ХПА-ФлуоГен) в протоколах ПЦР в Программе FluoGene были определены аллели генов HPA-4 b, HPA-9 a/b, то данные результаты в части аллелей генов HPA-4 b, HPA-9 a/b считать неподтвержденными.

Оценка определения аллелей генов HPA-4 b, HPA -9 a/b с помощью Набора реагентов HPA-FluoGene (ХПА-ФлуоГен) в ходе проведения клинических испытаний в РФ не проводилась, клиническая эффективность не доказана.

За более подробной информацией и консультацией обращайтесь к
уполномоченному представителю производителя
по телефону +7 (812) 777-06-05 или по адресу электронной почты info@nwcspsb.ru



Юридический центр Восстания 6, Бюро переводов
Санкт-Петербург, ул. Восстания, 6.
Тел. +7 812 660 06 06
Факс: +7 812 719 95 71
E-mail: trans@v6.spb.ru

Vosstaniya 6 Legal Centre, Translation Agency
St. Petersburg, Ul. Vosstaniya, 6
Tel. +7 812 660 06 06
Fax: +7 812 719 95 71
E-mail: trans@v6.spb.ru

Перевод с английского и немецкого языков

Утверждено
«инно-трейн Диагностик ГмбХ»
Александр Кекк
Управляющий
- подпись -
Подпись,
Дата
Печать

**Номер по нотариальному реестру документов: 114
за 2022 г.**

Нотариус Давид Яйтнер,
место нахождения: Франкфурт-на-Майне
канцелярия: Берлинер Штрассе 42а, 60311 Франкфурт-на-Майне, Германия

Настоящим свидетельствую вышестоящую подпись, признанную в моем присутствии

Александром **Кекком**,
управляющим, 25.02.1966 г. рождения,
официальный адрес: Нидерхёхштэдтер Штрассе 62, 61476 Кронберг/Таунус, Германия,
личность установлена в порядке предъявления удостоверения личности гражданина
Германии.

Подтверждается, что ни нотариус, ни кто-либо из сотрудников его конторы не
участвовали в деле, являющемся предметом нотариального заверения, вне исполнения
обязанностей нотариуса.

Франкфурт-на-Майне, 23 февраля 2022 г.

- подпись -

Давид Яйтнер
Нотариус

Гербовая печать (2): Давид Яйтнер. Нотариус Франкфурта-на-Майне.

Александр Кекк
Управляющий

Номер по нотариальному реестру документов: 115
за 2022 г.

Нотариус Давид Яйтнер,
место нахождения: Франкфурт-на-Майне
канцелярия: Берлинер Штрассе 42а, 60311 Франкфурт-на-Майне, Германия

Настоящим свидетельствую вышестоящую подпись, признанную в моем присутствии

Александром **Кекком**,
управляющим, 25.02.1966 г. рождения,
официальный адрес: Нидерхёхштэдтер Штрассе 62, 61476 Кронберг/Таунус, Германия,
личность установлена в порядке предъявления удостоверения личности гражданина
Германии.

Подтверждается, что ни нотариус, ни кто-либо из сотрудников его конторы не
участвовали в деле, являющемся предметом нотариального заверения, вне исполнения
обязанностей нотариуса.

Франкфурт-на-Майне, 23 февраля 2022 г.

- подпись -

Давид Яйтнер
Нотариус

Гербовая печать (2): Давид Яйтнер. Нотариус Франкфурта-на-Майне.

Накладная рельефная гербовая печать, скрепляющая документ: Давид Яйтнер.
Нотариус Франкфурта-на-Майне.

-----Конец перевода документа-----

Я, дипломированный переводчик Очкасова Татьяна Алексеевна, владеющая русским,
немецким и английским языками, подтверждаю, что выполненный мною перевод является
правильным, точным и полным.

Переводчик Очкасова Татьяна Алексеевна

САНКТ-

Петербург

Российская Федерация, Санкт-Петербург.

Двадцать первого марта две тысячи двадцать второго года.

Я, Погорельцева Марина Юрьевна, временно исполняющая обязанности нотариуса
нотариального округа Санкт-Петербурга Романовой Светланы Николаевны,
свидетельствую подлинность подписи переводчика Очкасовой Татьяны Алексеевны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшей документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 10/9-н/78-2022-13-1491.

Уплачено за совершение нотариального действия: 500 (пятьсот) рублей.

М.Ю. Погорельцева



Итого в настоящем документе 31 (тридцать один) лист
Вр.и.о. нотариуса: