УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ГОРДИЗ»
Леонов С.Н.

«15» декабря 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения числа повторов (TA) в гене UGT1A1 (синдром Жильбера) методом ПЦР с детекцией результата методом капиллярного электрофореза

«COrDIS GS»

COrDIS

ООО «ГОРДИЗ»,
Российская Федерация, 117246,
Город Москва, Научный проезд, дом 20, строение 3

IVD

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ....3
2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА....4
3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА....4
4. ПРИНЦИП МЕТОДА....4
4. ВАРИАНТЫ ИСПОЛНЕНИЯ И СОСТАВ НАБОРА....7
5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА....9
5.1. Аналитическая чувствительность....9
6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА....9
7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ....10
7.1. Требования безопасности при работе с набором....10
7.2. Требования охраны окружающей среды....11
8. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ....11
9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА....12
9.1. Материал для исследования....12
9.2. Предварительная обработка клинического материала....12
9.3. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой....12
10. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ....13
10.1. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК....13
10.2. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК....14
10.3. Проведение капиллярного электрофореза....14
11. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ....18
11.1. Детекция результатов....18
11.2. Интерпретация результатов....18
12. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ....20
12.1. Условия хранения....20
12.2. Транспортирование....20
13. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ....20
14. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ....20
15. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ....21
16. ПЕРЕЧЕНЬ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ....22

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
мкл	- микролитр
мл	- миллилитр

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «COrDIS GS» предназначен для определения числа повторов (TA) в гене UGT1A1 геномной ДНК человека, экстрагированной из образцов цельной крови с целью диагностики Синдрома Жильбера методом ПЦР с детекцией результата методом капиллярного электрофореза.

Набор предназначен для использования совместно с медицинским изделием «Анализатор Генетический Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007).

Функциональное назначение.

Функциональное назначение – Набор реагентов «COrDIS GS» предназначен для диагностики наследственной доброкачественной гипербилирубинемии, обусловленной мутацией в гене UGT1A1.

Набор предназначен для обследования всех групп населения любого возраста без градации по демографическому или популяционному признаку.

Полученные результаты не являются основанием для постановки диагноза, а используются только в сочетании с другими лабораторными показателями и диагностической информацией.

Научная обоснованность определяемых мутаций

Набор реагентов «COrDIS GS» предназначен для молекулярно-генетической диагностики Синдром Жильбера. Объектом исследования служит область гена UGT1A1, который кодирует фермент уридиндифосфат–глюкуронилтрансферазу 1 (УДФГТ1). Синдром Жильбера или семейная доброкачественная гипербилирубинемия носит наследственный характер. Непосредственной причиной развития синдрома Жильбера является нарушение обмена билирубина, вызванное мутацией в гене UGT1A1, который кодирует фермент уридиндифосфат–глюкуронилтрансферазу 1 (УДФГТ1). В этом случае обнаруживается изменение числа динуклеотидных повторов TA в промоторной области гена (полиморфный маркер rs8175347). У большинства людей промоторный регион включает шесть тандемных повторов, т.е. последовательность (TA)6 — аллель «дикого типа», для которой характерен нормальный уровень активности. При мутациях в промоторном регионе гена UGT1A1 появляется инсерция (вставка) дополнительного динуклеотида в области TA-повторов UGT1A1 и их число увеличивается до 7 повторов. В популяции среди аллелей с измененной экспрессией она является наиболее частой, ее наличие приводит к снижению активности УДФГТА1. Кроме того описаны более редкие варианты полиморфизмов с 8 и 5 повторами, которые ассоциированы с изменением уровня экспрессии фермента (Matsui K., Maruo Y., Sato H. et al. Combined effect of regulatory polymorphisms on transcription of UGT1A1 as a cause of Gilbert syndrome. BMC Gastroenterology. 2010; 10: 57. doi: 10.1186/1471- 230X-10-57).

Синдром Жильбера выявляется у 1-5 % населения. Синдром распространён среди европейцев (2-5 %), азиатов (3 %) и африканцев (36 %). Заболевание впервые проявляется в юношеском и молодом возрасте, в 8-10 раз чаще у мужчин. (Мельникова Л.И., Ильченко Л.Ю., Дунаева

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Е.А. и др. Выявление синдрома Жильбера методом пиросеквенирования у пациентов в реальной клинической практике. Архивъ внутренней медицины. 2019; 9(6): 475-482. DOI: 10.20514/2226- 6704-2019-9-6-475-482).
Аутосомно-рецессивный тип наследования при СЖ обеспечивает возможность «здоровому» гену компенсировать аномалии второго аллельного гена. В то же время снижение активности УДФГТА1 у лиц с наличием аллелей 7 и 8 (ТА)-повторов может приводить к усилению проявлений СЖ, а также к развитию нежелательных лекарственных реакций и межлекарственных взаимодействий в случаях применения препаратов, метаболизирующихся с участием этого фермента (Ипатова М.Г., Шумилов П.В., Шагалова Д.Л., Нестерова Т.А., Иванова А.С. Особенности фармакотерапии у пациентов с синдромом Жильбера // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. — 2015. — № 6. — С. 92-96).
ВНИМАНИЕ! *Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания[1] и могут служить дополнительным основанием для выбора стратегии лечения.*

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

Клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению: набор реагентов «COrDIS GS» может быть использован в клинической лабораторной диагностике для выявления Синдрома Жильбера.

3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА

Сотрудники клинико-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ДНК-диагностики.

4. ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение числа повторов (ТА) в гене UGT1A1 геномной ДНК человека, экстрагированной из образцов цельной крови с помощью набора реагентов «COrDIS GS» проводится методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим фрагментным анализом амплифицированных фрагментов.
На первом этапе исследуемый биоматериал подвергается процедуре экстракции ДНК. На следующем этапе исследования полученный препарат ДНК используется для проведения полимеразной цепной реакции. Олигонуклеотидные праймеры, используемые в наборе «COrDIS GS» содержат флуоресцентную метку, обеспечивающую возможность последующей оптической регистрации сигнала амплификации исследуемых молекулярных мишеней. Полученные флуоресцентно меченные ПЦР продукты анализируются методом капиллярного электрофореза и подвергаются сегрегации по длине фрагмента в акриламидном геле. Разделение продуктов ПЦР и детекция флуоресцентного сигнала производится в автоматическом режиме с использованием Анализатора генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (РУ № ФСЗ 2010/07007). Анализ полученных данных проводится в соответствии с Руководством для экспериментов по фрагментному анализу GeneMapper (на бумажном носителе или компакт-диске) для Анализатора генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007). Проводится идентификация исследуемых маркеров по распределению длин амплифицированных фрагментов и использованному флуоресцентному красителю, а также анализ гомогенности полученного сигнала амплификации.

[1] В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Исследуемые маркеры представляют собой область динуклеотидных ТА повторов геномной ДНК, в норме встречающиеся в геноме человека в варианте (ТА)6. Однако, в результате мутации, возможно, изменению числа нуклеотидных повторов. Количество повторов и размер амплифицируемых фрагментов известны и могут быть определены методом капиллярного электрофореза (Таблица 1).

Определение длины амплифицированного фрагмента происходит при сравнении относительной подвижности исследуемого фрагмента в полиакриламидном геле с подвижностью фрагментов размерного стандарта известной длины. Размерный стандарт S550, входящий в состав набора «COrDIS GS», представляет собой набор охарактеризованных синтетических олигонуклеотидов заведомо известной длины.

Ниже приводится пример электрофореграммы с сигналами фрагментов стандарта S550 в канале детекции Orange. Обозначения 26 фрагментов ДНК приводятся в соответствии с их размером: 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 450, 500, 550.

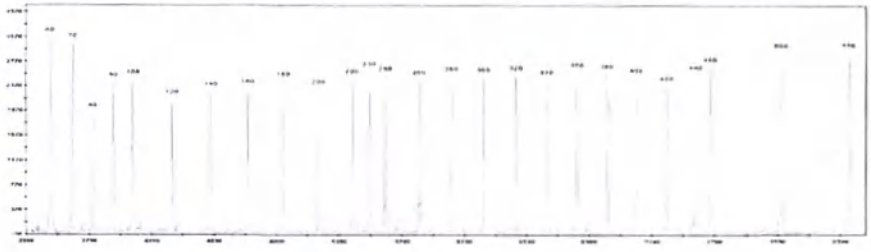


Рисунок 1. Электрофореграмма размерного стандарта S550.

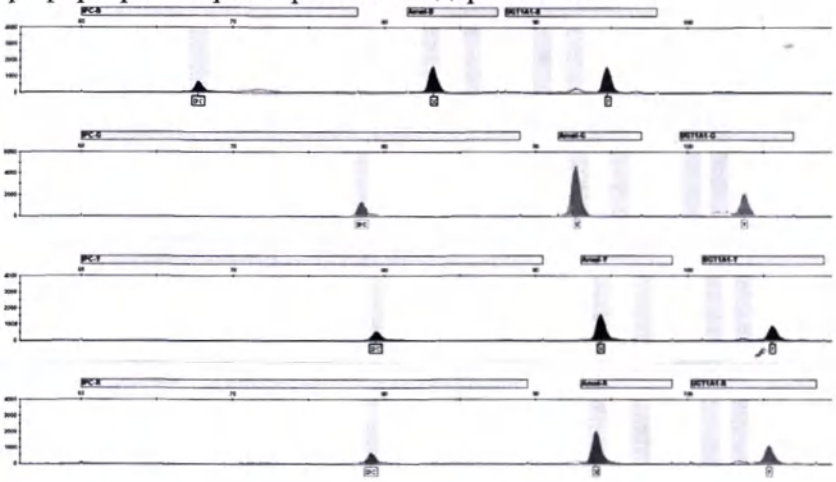


Рисунок 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных при исследовании положительного контрольного образца ДНК с использованием набора «COrDIS GS» в четырех вариантах исполнения набора.

Дополнительно, набор реагентов «COrDIS GS» позволяет определить половую принадлежность исследуемого образца. Метод определения половой принадлежности исследуемого образца геномной ДНК основан на различия в количестве нуклеотидов между Х-хромосомной (AMELX) и Y-хромосомной (AMELY) версиями гена амелогенина человека. Размер амплифицируемых фрагментов AMELX и AMELY известны и могут быть определены методом капиллярного электрофореза (Таблица 1). Присутствие в исследуемом образце версий гена AMELX и AMELY, свидетельствует о мужской принадлежности исследуемого образца ДНК, в то время как наличие только варианта AMELX свидетельствует о происхождении образца ДНК от лица женского пола. Результаты исследования последовательности гена амелогенина не имеют диагностического значения для выявления

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

синдрома Жильбера и служат только для генетической индивидуализации исследуемого биологического материала.

В наборе реагентов «COrDIS GS» предусмотрена внутренняя система контроля прохождения реакции амплификации. Контроль ПЦР осуществляется путем добавления в реакционную смесь синтетической олигонуклеотидной последовательности известной длинны (QC). При прохождении реакции амплификации ПЦР продукт QC нарабатывается и детектируется методом капиллярного электрофореза в независимости от присутствия в реакции исследуемого препарата ДНК человека (Таблица 1). Отсутствие продукта амплификации QC свидетельствует об ошибке в проведении этапа амплификации ДНК, и такой результат не может быть принят в качестве достоверного.

В зависимости от варианта исполнения набора, для флуоресцентного мечения ПЦР продуктов используются разные варианты красителей, влияющих на электрофоретическую подвижность анализируемых мишеней. Ожидаемые длины амплифицированных фрагментов для каждого варианта исполнения набора приведены в Таблице 1.

Таблица 1.

Характеристики анализируемых маркеров ДНК человека.

Вариант исполнения набора	**Маркер**	**Аллельный вариант**	**Длина амплифицируемого фрагмента (пар нуклеотидов)**
«COrDIS GS» BLUE	UGT1A1	(TA)5	91
		(TA)6	93
		(TA)7	95
		(TA)8	97
	AMEL	AMELX	83
		AMELY	86
	QC	–	77
«COrDIS GS» GREEN	UGT1A1	(TA)5	100
		(TA)6	102
		(TA)7	104
		(TA)8	106
	AMEL	AMELX	93
		AMELY	96
	QC	–	87
«COrDIS GS» YELLOW	UGT1A1	(TA)5	102
		(TA)6	104
		(TA)7	106
		(TA)8	108
	AMEL	AMELX	94
		AMELY	97
	QC	–	88
«COrDIS GS» RED	UGT1A1	(TA)5	102
		(TA)6	104
		(TA)7	106
		(TA)8	108
	AMEL	AMELX	94
		AMELY	97
	QC	–	88

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4. ВАРИАНТЫ ИСПОЛНЕНИЯ И СОСТАВ НАБОРА

Набор реагентов выпускается в 4 вариантах исполнения.
Различные комплектации набора реагентов предназначены для разграничения больших потоков образцов при организации массовых скрининговых исследований. Использование 4 каналов детекции позволяют разделить группы образцов в соответствии с желаемой цветовой кодировкой.

Вариант исполнения «COrDIS GS» BLUE

Набор рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контрольные образцы
В состав набора входят следующие комплекты:
1) «Комплект для амплификации», включающий:
- Реакционная смесь B – 1 пробирка (500 мкл)
- Раствор активатора – 1 пробирка (500 мкл)
- Деионизованная вода – 1 пробирка (1700 мкл)
2) «Комплект контрольных образцов», включающий:
- Положительный контроль – 1 пробирка (20 мкл)
- Отрицательный контроль – 1 пробирка (1700 мкл)
3) «Комплект для электрофореза», включающий:
- Размерный стандарт S550 – 1 пробирка (120 мкл)

Вариант исполнения «COrDIS GS» GREEN

Набор рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контрольные образцы
В состав набора входят следующие комплекты:
1) «Комплект для амплификации», включающий:
- Реакционная смесь G – 1 пробирка (500 мкл)
- Раствор активатора – 1 пробирка (500 мкл)
- Деионизованная вода – 1 пробирка (1700 мкл)
2) «Комплект контрольных образцов», включающий:
- Положительный контроль – 1 пробирка (20 мкл)
- Отрицательный контроль – 1 пробирка (1700 мкл)
3) «Комплект для электрофореза», включающий:
- Размерный стандарт S550 – 1 пробирка (120 мкл)

Вариант исполнения «COrDIS GS» YELLOW

Набор рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контрольные образцы
В состав набора входят следующие комплекты:
1) «Комплект для амплификации», включающий:
- Реакционная смесь Y – 1 пробирка (500 мкл)
- Раствор активатора – 1 пробирка (500 мкл)
- Деионизованная вода – 1 пробирка (1700 мкл)
2) «Комплект контрольных образцов», включающий:
- Положительный контроль – 1 пробирка (20 мкл)
- Отрицательный контроль – 1 пробирка (1700 мкл)
3) «Комплект для электрофореза», включающий:

- Размерный стандарт S550 – 1 пробирка (120 мкл)

Вариант исполнения «COrDIS GS» RED

Набор рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контрольные образцы
В состав набора входят следующие комплекты:
1) «Комплект для амплификации», включающий:
- Реакционная смесь R – 1 пробирка (500 мкл)
- Раствор активатора – 1 пробирка (500 мкл)
- Деионизованная вода – 1 пробирка (1700 мкл)
2) «Комплект контрольных образцов», включающий:
- Положительный контроль – 1 пробирка (20 мкл)
- Отрицательный контроль – 1 пробирка (1700 мкл)
3) «Комплект для электрофореза», включающий:
- Размерный стандарт S550 – 1 пробирка (120 мкл)

В состав комплектаций набора входят готовые к применению реагенты. Реакционная смесь и Раствор активатора содержат все необходимые компоненты для проведения ПЦР:
- раствор дНТФ;
- раствор специфичных флуоресцентно меченых праймеров;
- ПЦР-буфер;
- Taq-полимеразу;

Варианты исполнения «COrDIS GS» BLUE, «COrDIS GS» GREEN, «COrDIS GS» YELLOW, «COrDIS GS» RED отличаются составом «Комплектов для амплификации» и содержат Реакционную смесь с олигонуклеотидными последовательностями, меченными четырьмя различными флуоресцентными красителями. Различные красители, используемые в составе Реакционной смеси предназначены для последующего анализа полученных ПЦР продуктов в разных оптических каналах детекции:

Тип реакционной смеси	Вариант исполнения набора реагентов	Канал детекции
Реакционная смесь B	«COrDIS GS» BLUE	Blue
Реакционная смесь G	«COrDIS GS» GREEN	Green
Реакционная смесь Y	«COrDIS GS» YELLOW	Yellow
Реакционная смесь R	«COrDIS GS» RED	Red

Контрольный образец «Положительный контроль» представляет собой охарактеризованный препарат ДНК, содержащий соответственно мутантный аллель с семью тандемными повторами 7TA и аллель «дикого типа» с шестью тандемными повторами 6TA в гетерозиготном состоянии в концентрации 1 нг/мкл раствора. Контрольный образец «Отрицательный контроль» представляет собой деионизованную воду не содержащую ДНК человека.

Размерный стандарт S550 представляет собой смесь охарактеризованных по молекулярной массе флуоресцентно меченых фрагментов ДНК, используемых в качестве стандарта для определения размера амплифицированных ПЦР-продуктов при проведении фрагментного анализа методом капиллярного электрофореза.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

5.1. Аналитическая чувствительность

С помощью набора «COrDIS GS» может быть проведен анализ препарата ДНК, содержащего не менее 1 нг аутосомной ДНК человека в объеме 15 мкл. Концентрация целевой ДНК в исследуемом препарате должна быть не менее 0.07 нг/мкл.

5.2. Аналитическая специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к целевым нуклеотидным последовательностям исследуемых локусов, что исключает перекрестные реакции с другими участками генома человека. Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена в ходе испытаний посредством добавления в реакцию препаратов геномной ДНК человека, содержащих аллельные варианты (TA)7, и (TA)6 локуса UGT1A1.

Перекрестные результаты реакций при исследовании различных аллельных вариантов в исследуемых образцах ДНК зарегистрированы не были. Полученные в ходе испытаний результаты исследования специфичны и соответствуют ожидаемых в 100% проведенных исследований.

5.3. Предел обнаружения

Предел обнаружения геномной ДНК человека с использованием набора «COrDIS GS» составляет не менее 1 нг аутосомной ДНК человека в объеме 15 мкл. Концентрация целевой ДНК в исследуемом препарате должна быть не менее 0.07 нг/мкл.

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Валидация реагентов, входящих в состав набора, проведена в рамках клинических испытаний на 75 образцах цельной крови. В качестве метода сравнения для всех образцов проведено исследование с использованием Набора реагентов для определения числа повторов (5TA /6TA /7TA /8TA) в гене UGT1A1 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления (РеалБест-Генетика UGT1A 1) по ТУ 21.20.23-064-23548172-2019 (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/13659).

Сравнительные результаты испытаний подтверждают, что результаты исследования, полученные при использовании набора реагентов «COrDIS GS», эквивалентны результатам, полученным с использованием Набора реагентов для определения числа повторов (5TA /6TA /7TA /8TA) в гене UGT1A1 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления (РеалБест-Генетика UGT1A 1) по ТУ 21.20.23-064-23548172-2019 (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/13659).

Показатели диагностических характеристик для исследованных клинических образцов соответствуют значениям, приведенным в таблице 2.

Таблица 2.

Исследуемый генетический маркер	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
UGT1A	91,03-100%	90,36-100%

Повторяемость результатов исследования с использованием набора «COrDIS GS» подтверждена производителем в ходе проведения клинических испытаний.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Воспроизводимость результатов исследования с использованием набора «COrDIS GS» составляет 100% и подтверждена в ходе проведения клинических испытаний на разных сериях набора (внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость).

Правильность результатов исследования с использованием набора «COrDIS GS» подтверждена с использованием Набора реагентов для определения числа повторов (5TA /6TA /7TA /8TA) в гене UGT1A1 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления (РеалБест-Генетика UGT1A 1) по ТУ 21.20.23-064-23548172-2019 (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/13659).

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

7.1. Требования безопасности при работе с набором

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» 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 всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует 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 или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы 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 населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности и получившим дополнительное

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

7.2. Требования охраны окружающей среды

Набор реагентов не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности. В том числе в случае отклонений в функционировании медицинского изделия, включая определяемые по внешним признакам.

Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.

Набор реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав набора не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. Реагенты, входящие в состав набора, безопасны для окружающей среды, не содержат цианид и азид натрия, а также другие вредные вещества.

Набор реагентов не содержит: лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсибилизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

8. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С." по ТУ 9443-004-51495026-2004 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия, ФСР 2010/07114).
2. Центрифуга "Фуга/вортекс Микро-Спин FV-2400" (Biosan, Латвия, ФС № 2005/518).
3. Дозаторы пипеточные Eppendorf Research Plus с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/11028).
4. Наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных систем ("Эксиджен, Инк.", США, ФСЗ 2012/12077).
5. Одноразовые полипропиленовые тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой. Например, Изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro ("Эксиджен, Инк.", США, ФСЗ 2012/11892).
6. Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/09244).
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Анализатор генетический Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007):
   - Полимер POP-4 3,5 мл на 384 прогона (2 упаковки);
   - Hi-Di Formamide 5 мл (2 упаковки);
   - Плашки реакционные оптические 96-луночные MicroAmp для ПЦР со штрих-кодом (1 упаковка);
   - Картридж с капиллярами 8х36см или 24х36см (1 упаковка)
   - Контейнер с анодным буфером (1 упаковка)
   - Контейнер с катодным буфером (1 упаковка)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

9. Холодильник, поддерживающий температуру +4°С, например XM-4424-000-N «ATLANT» (ЗАО «АТЛАНТ», Россия).
10. Холодильник, поддерживающий температуру -20°С, например Liebherr LGT 3725 (Liebherr, Австрия).

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

9.1. Материал для исследования

Материалом для исследования набором реагентов «COrDIS GS» являются образцы ДНК, выделенные из клинических проб (образцов цельной крови).

Взятие, доставка и хранение клинических образцов

Особенности взятия образцов цельной крови.

Кровь забирается в вакуумную пробирку с антикоагулянтом. 2-3 мл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку, содержащую порошок или раствор антикоагулянта (1,2 – 2,0 мг К2-ЭДТА или 3,8% (0,129 моль/л) раствор цитрата натрия). Не допускается использование ГЕПАРИНА в качестве антикоагулянта. При использовании системы вакуумного забора крови используются вакутейнеры с фиолетовой крышкой (ЭДТА) или голубой (цитрат натрия). После забора крови её необходимо плавными движениями перемешать с антикоагулянтом, находящимся в пробирке. Транспортировать и хранить образцы следует: при (2–8) °С не более 1 недели; или при минус (18−60) °С не более 1 месяца.

9.2. Предварительная обработка клинического материала

Обработка клинического материала для выделения ДНК, а также его хранение производится согласно инструкции производителя набора для выделения ДНК из образцов цельной крови.

Для подготовки образцов ДНК могут быть использованы любые зарегистрированные на территории РФ наборы реагентов для пробоподготовки с сорбентной очисткой, предназначенные для выделения нуклеиновых кислот (ДНК) из клинического материала (цельная кровь) для ПЦР-диагностики и позволяющие максимально удалить ингибиторы ПЦР из образца. Предпочтение следует отдавать наборам реагентов для пробоподготовки, позволяющим максимально удалить ингибиторы ПЦР из образца, например, зарегистрированный в установленном порядке Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала НК-сорбент для диагностики in vitro по 21.20.23-232-17253567-2018 (ООО НПФ «Литех», Регистрационное удостоверение № РЗН 2019/9331).

9.3. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой

При использовании специализированных наборов реагентов для экстракции ДНК из образцов крови, например Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала НК-сорбент для диагностики in vitro по 21.20.23-232-17253567-2018 (ООО НПФ «Литех», Регистрационное удостоверение № РЗН 2019/9331), предусмотрена стадия очистки препарата от посторонних примесей. Использование рекомендованных наборов для экстракции ДНК, например Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала НК-сорбент для диагностики in vitro по 21.20.23-232-17253567-2018 (ООО НПФ «Литех», Регистрационное удостоверение № РЗН 2019/9331), позволяет исключить содержание в исследуемых препаратах ДНК потенциально интерферирующих веществ в

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

концентрациях, которые способных оказать влияние на проведение полимеразной цепной реакции.

Производителем Набора реагентов «COrDIS GS» было показано сохранение эффективности работы набора при выделении ДНК из цельной крови в случае присутствия в клинических образцах потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, соответствующих верхней границе физиологической нормы, и превышающих их в несколько раз.

Образец	Интерферент	допустимое содержание в образце
Цельная кровь	ЭДТА	100 uM
	Цитрат натрия	100 uM
	Гематин	200 uM

10. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование биоматериала с использованием набора реагентов «COrDIS GS» включает следующие этапы:

- Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК.
- Проведение фрагментного анализа полученных ПЦР продуктов методом капиллярного электрофореза.
- Анализ и интерпретация результатов.

10.1. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 15 мкл.

1) Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке на 1,5 мл для необходимого количества исследований из расчета 5 мкл Реакционной смеси и 5 мкл Раствора активатора на одну пробу. Смесь необходимо приготовить с запасом на 1 образец. После приготовления реакционной смеси тщательно перемешать ее на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

2) Внести в каждую пробирку по 10 мкл готовой реакционной смеси.

3) В пробирки с реакционной смесью, используя наконечники с фильтром, внести до 15 мкл исследуемого препарата ДНК (в зависимости от концентрации исследуемого препарата) и довести Деионизованной водой до общего объема 25 мкл. При постановке реакции с контрольными образцами (Положительный контроль и Отрицательный контроль) внести в пробирки с реакционной смесью 14 мкл Деионизованной воды и 1 мкл раствора исследуемого Контрольного образца.

4) Осторожно перемешать пипетированием.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

10.2. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК

1. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 3).

Таблица 3

Программа амплификации «COrDIS GS»

Шаг программы	Температура, °С	Время инкубации, сек.	Количество циклов
1	95	120	1
2	96	10	28
3	58	30	
4	72	30	
2	96	10	5
3	62	30	
4	72	30	
5	68	10 мин	1
6	15	∞	1

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации.
4. По окончании выполнения программы приступить к этапу проведения капиллярного электрофореза полученных ПЦР продуктов.

10.3. Проведение капиллярного электрофореза

Фрагментный анализ полученных ПЦР продуктов проводиться в соответствии с Руководством для экспериментов по фрагментному анализу GeneMapper для Анализатора Генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007).

1. Предварительная настройка прибора

Предварительная настройка Анализатора Генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007) включает создание пользовательских протоколов для проведения исследования (**Instrument Protocol**)[2].

1.1 Создание Instrument Protocol

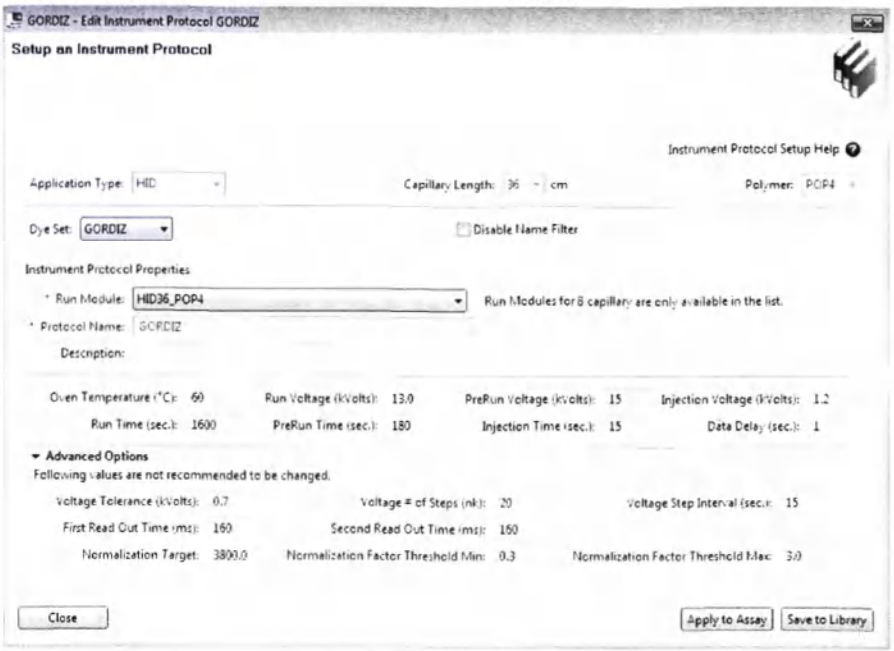
Перейти в раздел Library в программе Data Collection Software.
В разделе Analyze, выбрать вкладку Instrument Protocols. В открывшемся меню нажать кнопку Create (откроется диалоговое окно создания нового Instrument Protocol). В появившемся окне указать параметры нового Instrument Protocol:

Application Type HID
Run Module например “HID36_POP4”
(выбрать протокол, соответствующий параметрам системы)

[2] При первичном использовании прибора требуется проведение спектральной калибровки Анализатора по каналам Blue, Green, Yellow, Red, Orange в соответствии с Руководством для экспериментов по фрагментному анализу GeneMapper для Анализатора Генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Protocol Name COrDIS



Рекомендуемые параметры электрофореза:

Параметр	Значение
Oven Temperature	60
PreRun Voltage	15
PreRun Time	180
Injection Voltage	1.2
Injection Time	15
Data Delay Time	1
Run Voltage	13.0
Run Time	1600

Нажать кнопку Save.

В зависимости от состояния используемого прибора параметр Injection Time может быть скорректирован пользователем для достижения оптимальной амплитуды флуоресцентного сигнала. Параметр Run Time также может быть скорректирован пользователем в случае, если рекомендуемое время фореза является избыточным (все фрагменты размерного стандарта детектируются существенно раньше отведенного времени) или недостаточным (не все фрагменты размерного стандарта детектируются за отведенное время). Оптимальное время фореза в наибольшей степени зависит от текущего состояния капилляров и полимера в генетическом анализаторе и может меняться со временем.

1.3 Создание Assay

Перейти в раздел Library в программе Data Collection Software.
В разделе Manage, выбрать вкладку Assays. В открывшемся меню нажать кнопку Create (откроется диалоговое окно создания нового Assay). В появившемся окне указать параметры нового Assay:

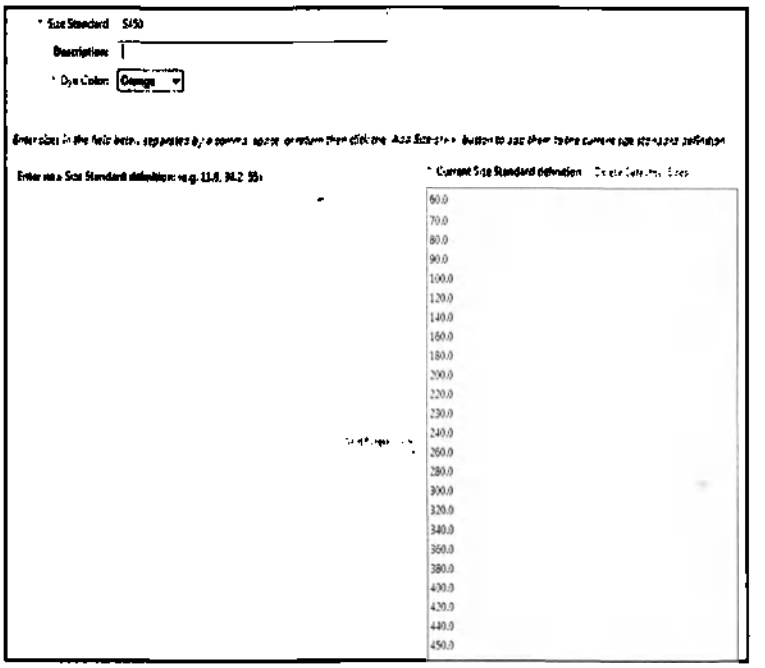
Assay Name	COrDIS
Application Type	HID

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Нажать кнопку Save.

1.4 Создание Size Standard

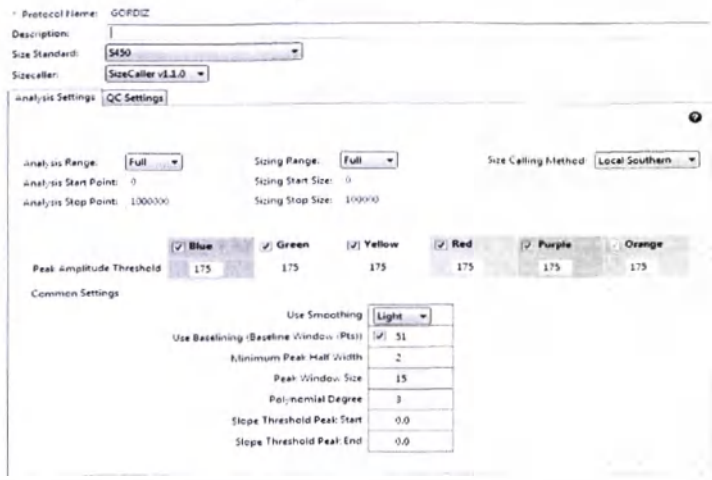
Перейти в раздел Library в программе Data Collection Software.
В разделе Analyze, выбрать вкладку Size Standards. В открывшемся меню нажать кнопку Create (откроется диалоговое окно создания нового Size Standard). В появившемся окне указать параметры нового Size Standard:

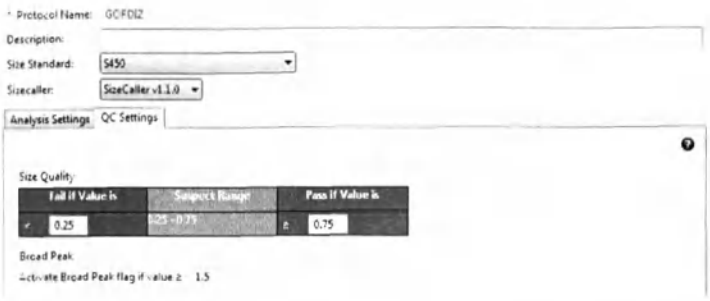


Нажать кнопку Save.

1.5 Создание QC Protocol

Перейти в раздел Library в программе Data Collection Software.
В разделе Analyze, выбрать вкладку QC Protocols. В открывшемся меню нажать кнопку Create (откроется диалоговое окно создания нового QC Protocol). В появившемся окне указать параметры нового QC Protocol:





Нажать кнопку Save.

Подготовка и загрузка продуктов амплификации

Для загрузки образцов в прибор необходимо приготовить смесь Hi-Di™ формамида и размерного стандарта S550 в следующем соотношении:

Компонент	Объем на один образец
Hi-Di™ формамид	10.0 мкл
Размерный стандарт S550	1.0 мкл

При расчете объемов компонентов смеси следует учесть, что формамидом должны быть заполнены все лунки, в которых будет происходить инжекция, в том числе и лунки, не содержащие образцы.

После перемешивания добавить по 10 мкл приготовленной смеси в каждую лунку планшета. Добавить в каждую лунку со смесью формамида и размерного стандарта S550 по 1 мкл полученного ПЦР продукта. При необходимости удалить пузыри со дна лунок планшета коротким центрифугированием. Накрыть планшет резиновым ковриком, загрузить в прибор и произвести запуск электрофореза.

2 Запуск прибора

Проведение капиллярного электрофореза на Анализаторе Генетическом Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007) проводится в соответствии с инструкцией пользователя, предоставляемой производителем. Для получения корректных результатов необходимо создать соответствующую спектральную калибровку, выполнив следующие шаги:

Шаг А – Создание планшета

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Перед началом анализа необходимо создать Plate (планшет), описывающий расположение образцов на планшете и содержащий инструкции для прибора. Для этого необходимо перейти в меню Create New Plate программы Data Collection Software. Появится диалоговое окно, в котором необходимо указать параметры нового планшета:

Name	Например COrDIS_[*дата*]
Plate Type	Fragment

Нажать кнопку OK. Появится новая таблица со схемой исследуемого планшета.

Шаг B – Заполнение таблицы

Для всех анализируемых лунок планшета необходимо указать:

Sample name	имя объекта
Sample type	тип образца
Assay	COrDIS
Filename convention	структура имени файла
Results group	параметры сохранения файлов

Шаг C – Запуск прибора и информация о статусе прибора

После создания схемы расположения образцов на планшете, нажмите на кнопку Link Plate for Run. В открывшемся окне указать положение планшета в приборе и запустить электрофорез нажатием кнопки Start Run.

11. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Детекция результатов

Детекция флуоресцентного сигнала продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из каналов детекции. Анализ полученных данных проводиться в соответствии с Руководством для экспериментов по фрагментному анализу GeneMapper (на бумажном носителе или компакт-диске) для Анализатора генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007).

11.2. Интерпретация результатов

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу детекции соответствующему используемому Варианту исполнения набора:

Вариант исполнения набора реагентов	Канал детекции
«COrDIS GS» BLUE	Blue
«COrDIS GS» GREEN	Green
«COrDIS GS» YELLOW	Yellow
«COrDIS GS» RED	Red

Ррегистрируется сигнал амплификации исследуемых маркеров в диапазоне длин фрагментов, представленных в табл. 4

При этом, результаты электрофоретического исследования анализируемых образцов ДНК могут считаться достоверными только при условии обнаружения как минимум одного сигнала амлификации для локусов QC, AMEL, UGT1A1 и всех 26 фрагментов размерного стандарта S550 по каналу детекции Orange. В случае отсутствия на электрофореграмме по каналу детекции Orange хотя бы одного из фрагментов размерного стандарта S550, результаты

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

исследования не могут считаться достоверными. В этом случае требуется провести повторное исследования образца.
Результаты анализа локуса UGT1A1 интерпретируются в зависимости от выявленного аллельного варианта.

Принцип интерпретации результатов анализа полиморфизма гена UGT1A1:

- **Выявлен генетический маркер синдрома Жильбера,** если при исследовании полиморфизма гена UGT1A1 выявлен гомозиготный вариант (TA)7/(TA)7.
- **Выявлено носительство мутантного аллельного варианта гена UGT1A1,** если при исследовании полиморфизма гена UGT1A1 выявлен гетерозиготный вариант (TA)6/(TA)7.
- **Не выявлено генетических маркеров синдрома Жильбера,** если при исследовании полиморфизма гена UGT1A1 выявлен гомозиготный вариант (TA)6/(TA)6.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены ожидаемые результаты для положительного и отрицательного контрольных образцов, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 4).

Таблица 4

Результаты оценки контрольных реакций

Вариант исполнения набора	Анализируемая мишень	Положительный контроль (результат исследования)	Отрицательный контроль (результат исследования)
«COrDIS GS» BLUE	QC	1 фрагмент с длиной 77 п.н.	1 фрагмент с длиной 77 п.н.
	AMEL	2 фрагмента с длиной 83/86 п.н.	не детектируется
	UGT1A1	2 фрагмента с длиной 93/95 п.н.	не детектируется
«COrDIS GS» GREEN	QC	1 фрагмент с длиной 87 п.н.	1 фрагмент с длиной 87 п.н.
	AMEL	2 фрагмента с длиной 93/96 п.н.	не детектируется
	UGT1A1	2 фрагмента с длиной 102/104 п.н.	не детектируется
«COrDIS GS» YELLOW	QC	1 фрагмент с длиной 88 п.н.	1 фрагмент с длиной 88 п.н.
	AMEL	2 фрагмента с длиной 94/97 п.н.	не детектируется
	UGT1A1	2 фрагмента с длиной 104/106 п.н.	не детектируется
«COrDIS GS» RED	QC	1 фрагмент с длиной 88 п.н.	1 фрагмент с длиной 88 п.н.
	AMEL	2 фрагмента с длиной 94/97 п.н.	не детектируется
	UGT1A1	2 фрагмента с длиной 104/106 п.н.	не детектируется

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если результаты анализа хотя бы одного из исследуемых маркеров в образцах Положительный контроль и Отрицательный контроль не соответствуют ожидаемым, приведенным в Таблице 4. Возможная причина: ошибки при постановке ПЦР реакции. Необходимо провести постановку реакции ПЦР еще раз.
2. Если хотя бы для одного из исследуемых маркеров в образцах Положительный контроль и Отрицательный контроль отсутствует сигнал амплификации. Возможная причина: ошибки при постановке ПЦР реакции. Необходимо провести повторную постановку реакции ПЦР.
3. Если хотя бы для одного из исследуемых маркеров в пробе с исследуемым образцом отсутствует сигнал амплификации. Возможная причина: ошибки при постановке ПЦР реакции. Необходимо провести повторную постановку реакции ПЦР.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

12. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

12.1. Условия хранения

Набор реагентов «COrDIS GS» всех вариантов исполнения должен храниться в защищенном от света месте при температуре от -25°С до -20°С в течение всего срока годности. После начала использования Набор реагентов должен быть разукомплектован. «Комплект для амплификации» и «Комплект контрольных образцов» должны храниться в зоне «пре-ПЦР», а «Комплект для электрофореза» должен храниться в зоне «пост-ПЦР». Все компоненты набора допускается хранить при температуре от -25°С до -20°С в течение всего срока годности. Срок годности Наборов – 18 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

12.2. Транспортирование

Набор реагентов «COrDIS GS» всех вариантов исполнения транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств. Условия транспортирования набора должны соответствовать условиям хранения!

Набор реагентов транспортировать в течение 7 суток при температуре от -25 до -20 °С. Обеспечение температурного режима при транспортировке наборов обеспечивается использованием хладоэлементов (-20°С) или с использованием сухого льда.

13. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

14. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 121205 г. Москва, территория инновационного центра Сколково, ул. Большой Бульвар, д.42, стр. 1, эт.1 пом.337, тел./факс (499) 670-40-41, email: gordiz@gordiz.ru

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ –

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

15. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора «COrDIS GS», следует обращаться в ООО «ГОРДИЗ» по адресу: Российская Федерация, 117246, Москва, Научный проезд, дом 20, строение 3, телефон/факс: 8 (499) 670-40-41, или e-mail: gordiz@gordiz.ru

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

16. ПЕРЕЧЕНЬ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ

	Названия документов
Приказ МЗ РФ №4н от 06.06.2012	Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий
ГОСТ 2.114-2016	Единая система конструкторской документации. Технические условия.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации
ГОСТ 31508-2012	Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации
ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003)	Лаборатории медицинские. Требования безопасности.
ГОСТ 3885-73	Реактивы и особо чистые вещества. Правила приемки, отбор проб, фасовка и маркировка.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики invitro.
ГОСТ 17.2.3.02-2014	Правила установления допускаемых выбросов загрязняющих веществ промышленными предприятиями
ГОСТ 17.2.3.01-1986	Охрана природы. Атмосфера. Правила контроля качества воздуха населенных пунктов
ГН 2.1.6.1338-03	ПДК загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест
ГН 2.2.5.1313-03	ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны
СП 2.2.2.1327-03	Гигиенические требования к организации технологических процессов, производственному оборудованию и рабочему инструменту
СП 1.3.2322-08	Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней
СанПиН 2.1.3684-21	СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»
МУ 1.3.2569-09	Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
LOT	Код партии		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
IVD	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Использовать до
VER	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Верхнее ограничение температуры		Дата изготовления
	Изготовитель		

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 23 ЛИСТОВ

«15» 12 2021 год

Ген.Директор
ООО «ГОРДИЗ»
Леонов С.Н.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

«УТВЕРЖДАЮ»
ЛЕОНОВ С.Н.
Генеральный директор
ООО «ГОРДИЗ»
15.01.2021

Инструкция по применению
КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА ПРЕДПРИЯТИЯ
для проверки чувствительности МИ Набор реагентов для определения числа повторов (TA) в гене UGT1A1 (синдром Жильбера) методом ПЦР с детекцией результата методом капиллярного электрофореза
«COrDIS GS»

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Контрольный образец предприятия ООО «ГОРДИЗ» предназначен для проведения контроля качества МИ Набор реагентов для определения числа повторов (ТА) в гене UGT1A1 (синдром Жильбера) методом ПЦР с детекцией результата методом капиллярного электрофореза «COrDIS GS». Контрольный образец «предприятия применяется для контроля показателей качества набора реагентов «COrDIS GS»:

Наименование показателя	Характеристика и норма для набора реагентов «COrDIS GS» Вариант исполнения «COrDIS GS» BLUE
Чувствительность	Детекция фрагментов ДНК по каналу детекции Blue – 5 максимумов интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 93 п.н. 95 п.н. 83 п.н. 86 п.н. 77 п.н.

Наименование показателя	Характеристика и норма для набора реагентов «COrDIS GS» Вариант исполнения «COrDIS GS» GREEN
Чувствительность	Детекция фрагментов ДНК по каналу детекции Green – 5 максимумов интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 102 п.н. 104 п.н. 93 п.н. 96 п.н. 87 п.н.

Наименование показателя	Характеристика и норма для набора реагентов «COrDIS GS» Вариант исполнения «COrDIS GS» YELLOW
Чувствительность	Детекция фрагментов ДНК по каналу детекции Yellow – 5 максимумов интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 104 п.н. 106 п.н. 94 п.н. 97 п.н. 88 п.н.

Наименование показателя	Характеристика и норма для набора реагентов «COrDIS GS» Вариант исполнения «COrDIS GS» RED
Чувствительность	Детекция фрагментов ДНК по каналу детекции Red – 5 максимумов интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 104 п.н. 106 п.н. 94 п.н. 97 п.н. 88 п.н.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

2. ОПИСАНИЕ

Контрольный образец предприятия ООО «ГОРДИЗ» представляет собой раствор препарата геномной ДНК человека, экстрагированной из образца биоматериала человека с известным генотипом локусов AMEL (генотип AMELX/AMELY) и UGT1A1 (генотип (TA)6/(TA)7). Контрольный образец предприятия производства ООО «ГОРДИЗ» проходит входной контроль в соответствии с СОП по приготовлению «Контрольного образца предприятия».

3. АТТЕСТОВАННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Контрольный образец предприятия представляет собой раствор ДНК для проверки чувствительности МИ. Содержит геномную ДНК человека в концентрации 1 нг/мкл. Локусы AMEL (генотип AMELX/AMELY) и UGT1A1 (генотип (TA)6/(TA)7) содержат известные аллельные варианты. Концентрация ДНК в образце «Положительный контроль» определяется на Спектрофотометре NanoDrop 2000c (Свидетельство об утверждении типа средств измерений №56026-13).

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

Для анализа Контрольного образца предприятия ООО «ГОРДИЗ» необходимо следующее оборудование и материалы:

1.Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С." по ТУ 9443-004-51495026-2004 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия, ФСР 2010/07114).

2.Центрифуга "Фуга/вортекс Микро-Спин FV-2400" (Biosan, Латвия, ФС № 2005/518).

3.Дозаторы пипеточные Eppendorf Research Plus с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/11028).

4.Наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных систем ("Эксиджен, Инк.", США, ФСЗ 2012/12077).

5.Одноразовые полипропиленовые тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой. Например, Изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro ("Эксиджен, Инк.", США, ФСЗ 2012/11892).

6.Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/09244).

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

8.Анализатор генетический Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007):

- Полимер POP-4 3,5 мл на 384 прогона (2 упаковки);
- Hi-Di Formamide 5 мл (2 упаковки);
- Плашки реакционные оптические 96-луночные MicroAmp для ПЦР со штрих-кодом (1 упаковка);
- Картридж с капиллярами 8x36см или 24x36см (1 упаковка)
- Контейнер с анодным буфером (1 упаковка)
- Контейнер с катодным буфером (1 упаковка)

9.Холодильник, поддерживающий температуру +4°С, например XM-4424-000-N «ATLANT» (ЗАО «АТЛАНТ», Россия).

10.Холодильник, поддерживающий температуру -20°С, например Liebherr LGT 3725 (Liebherr, Австрия).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

5. УСЛОВИЯ И ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ.

Исследование Контрольного образца предприятия ООО «ГОРДИЗ» проводиться с использованием набора реагентов «COrDIS GS» и в соответствии с Инструкцией по применению набора «COrDIS GS» для всех вариантов исполнения набора.
Амплификация исследуемых локусов ДНК проводится с использованием комплекта реагентов «Комплект для амплификации».
Проводиться постановка двух ПЦР реакций: Контрольный образец предприятия в количестве 1 нг ДНК в реакции - в двух повторах. Проводится ПЦР в соответствии с рекомендованной программой амплификации:

Шаг программы	Температура, оС	Время инкубации, сек.	Количество циклов
1	95	120	1
2	96	10	28
3	58	30	
4	72	30	
2	96	10	5
3	62	30	
4	72	30	
5	68	10 мин	1
6	15	∞	1

Фрагментный анализ полученных ПЦР-фрагментов исследуемых локусов ДНК проводят с использованием комплекта реагентов «Комплект для электрофореза» на Анализаторе генетическом Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (РУ № ФСЗ 2010/07007) проводится в соответствии с Руководством для экспериментов по фрагментному анализу Gene Mapper (на бумажном носителе или компакт-диске) для Анализатора генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007).

Анализ считается действительным, только если для всех исследованных маркеров детектируется сигнал флуоресценции в заявленном диапазоне длин амплифицированных продуктов с интенсивностью сигнала не ниже 100 rfu (относительных флуоресцентных единиц). Полученные результаты электрофоретического исследования по каналам детекции Blue, Green, Yellow и Red (в соответствии с используемым вариантом исполнения набора) должны соответствовать следующим параметрам:

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Вариант исполнения набора	Анализируемая мишень	Контрольный Образец предприятия (результат исследования)
«COrDIS GS» BLUE	QC	1 фрагмент с длиной 77 п.н.
	AMEL	2 фрагмента с длиной 83/86 п.н.
	UGT1A1	2 фрагмента с длиной 93/95 п.н.
«COrDIS GS» GREEN	QC	1 фрагмент с длиной 87 п.н.
	AMEL	2 фрагмента с длиной 93/96 п.н.
	UGT1A1	2 фрагмента с длиной 102/104 п.н.
«COrDIS GS» YELLOW	QC	1 фрагмент с длиной 88 п.н.
	AMEL	2 фрагмента с длиной 94/97 п.н.
	UGT1A1	2 фрагмента с длиной 104/106 п.н.
«COrDIS GS» RED	QC	1 фрагмент с длиной 88 п.н.
	AMEL	2 фрагмента с длиной 94/97 п.н.
	UGT1A1	2 фрагмента с длиной 104/106 п.н.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

В КОЛИЧЕСТВЕ 5 ЛИСТОВ

«15» 12 2021 год

Ген.Директор
ООО «ГОРДИЗ»
Леонов С.Н.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU