

«LightCycler 96» (Roche)

1. По окончании амплификации открыть файл завершеного анализируемого эксперимента в рабочей программе **LightCycler 96**.
2. Открыть вкладку **Analysis**. На панели инструментов кликнуть по значку **Add Analysis**, чтобы добавить новый анализ. Откроется диалоговое окно **Create New Analysis**.
3. Выбрать **Endpoint Genotyping**. Нажать ОК.
4. Во вкладке **Analysis** в соответствии с исходными настройками находятся четыре окна с результатами эксперимента.
5. Указать специфичные настройки в диалоговом окне **Endpoint Genotyping Settings** во вкладке **Parameters**:
 - **Pos/Neg Threshold**: 0,3
 - **Angle FAM**: 30 - 40
 - **Angle HEX**: 75 – 80
6. Программа автоматически интерпретирует результаты.

«CFX96» (BioRad)

1. Для каналов FAM и HEX выставить следующие настройки:
Cycles to Analyze 5-40
2. На вкладке **Allelic discrimination** в поле **Selected Fluorophores** назначить для аллели 1 канал **HEX**, для аллели 2 – канал **FAM**.
3. Программа автоматически интерпретирует результаты.

«ДТ96» (ДНК-технология)

1. Критерии положительного результата ПЦР 60%
2. Для каналов FAM и HEX выставить следующие настройки:
Канал HEX **Threshold** 20
Канал FAM **Threshold** 200
3. Программа автоматически интерпретирует результаты.

Проверить соответствие генотипов контрольных образцов заявленным:

Положительный контрольный образец 11 – Allele 1

Положительный контрольный образец 22 – Allele 2

По всем вопросам обращайтесь в офис компании ООО НПФ «Литех»:
телефон (495) 258-39-47, e-mail: info@lytech.ru



ПАМЯТКА ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА
ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНЕ HFE,
АССОЦИИРОВАННЫХ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ГЕМОХРОМАЗОЗА,
МЕТОДОМ ПЦР

КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАЗОЗ
SNP-SHOT OneStep-PB-96, 24 теста

ВСЕ КОМПОНЕНТЫ УЖЕ ВНЕСЕНЫ. ДОБАВЬТЕ ТОЛЬКО ОБРАЗЦЫ И КОНТРОЛИ.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Система «SNP-SHOT» представляет собой комплект реагентов для выявления мутаций (полиморфизмов) в геноме человека.

В каждой амплификационной смеси на полиморфизмы в гене HFE содержатся праймеры, необходимые для амплификации участка, содержащего полиморфизм, и два аллель-специфичных гидролизных зонда, содержащих полиморфный сайт. Зонд, содержащий полиморфизм Аллель 1, мечен флуорофором **HEX**, аллель 2 – флуорофором **FAM**. Дискриминация аллелей осуществляется за счёт различной эффективности разрушения Taq-полимеразой полностью и неполностью комплементарного зонда.

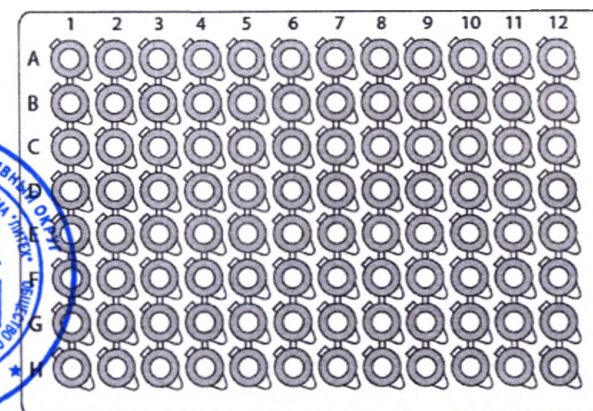
Результаты анализа позволяют дать **три типа заключений**:

гомозигота по аллелю 1; гетерозигота; гомозигота по аллелю 2.

В амплификационной смеси HBB, предназначенной для контроля взятия материала, содержатся праймеры и гидролизный зонд, необходимые для амплификации и детекции участка b-глобина человека (HBB), что позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации: выявлять наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию, а также исключать из анализа пробы с недостаточным содержанием ДНК человека.

СОСТАВ НАБОРА

Набор состоит из 96 пробирок с амплификационной смесью под слоем масла, по 24 пробирки на каждую амплификационную смесь. Один стрип предназначен для исследования двух клинических образцов на 3 полиморфизма и один контроль взятия материала. Пробирки с амплификационной смесью на определенный полиморфизм расположены согласно приведенной ниже схеме:



- A. HFE His63Asp
- B. HFE Ser65Cys
- C. HFE Cys282Tyr
- D. HBB
- E. HFE His63Asp
- F. HFE Ser65Cys
- G. HFE Cys282Tyr
- H. HBB

«Утверждаю»

Подпись



Отдельно вложены пробирка с разбавителем, который используется в качестве единого отрицательного контроля, и пробирки с положительными контрольными образцами для всех амплификационных смесей в отдельном пакете.

ВНИМАНИЕ! При работе с прибором «LightCycler 96» (Roche) следует проверить, что амплификационная смесь расфасована в низкопрофильный пластик.

ОБОЗНАЧЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ

Кат №	Ген	Аминокисл отная замена	Нуклео тидная замена	SNP ID	Аллель		Каналы
t01191	HFE	His63Asp	C>G	rs1799945	(C)	Аллель 1	HEX
					(G)	Аллель 2	FAM
t01192	HFE	Ser65Cys	A>T	rs1800730	(A)	Аллель 1	HEX
					(T)	Аллель 2	FAM
t01193	HFE	Cys282Tyr	G>A	rs1800562	(G)	Аллель 1	HEX
					(A)	Аллель 2	FAM
t01136	HBB						HEX

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

1. Достать из коробки необходимое число пробирок (стрипов) и расставить в соответствии с заранее подготовленным протоколом. Маркировка пробирок не допустима.

2. Полностью разморозить содержимое пробирок.

При необходимости, если часть раствора находится на внутренней стороне крышки пробирки, отцентрифугировать пробирки 3-5 сек на плашечной центрифуге или на микроцентрифуге-вортексе.

3. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 5 мкл:

- в пробирки **исследуемых образцов** – исследуемые образцы ДНК;
- в пробирку **отрицательного контрольного образца** – разбавитель из комплекта набора;
- в пробирки **положительных контрольных образцов** – положительные контрольные образцы ДНК из комплекта используемого набора.

4. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 1500–3000 об/мин на плашечной центрифуге или на микроцентрифуге-вортексе.

5. Создать протокол расположения образцов.

1) При работе на приборе «CFX 96» (BioRad) положительные контрольные образцы и исследуемые образцы обозначить как **Unknown**, отрицательный контроль обозначить как **NTC**.

000 ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU логия) создать следующий тест:

Тип: анализ полиморфизмов, 2 краски.

При необходимости назначить каналам FAM и HEX соответствующие аллели
Указать параметры анализа полиморфизмов:

- гетерозигота dCp < 3,0
- гомозигота dCp > 6,0

Для работы с наборами «SNP-SHOT» используются следующие каналы:

- канал **HEX**– АЛЛЕЛЬ 1
- канал **FAM**– АЛЛЕЛЬ 2

Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по заданному для образцов каналу.

6. Перенести пробирки в прибор и провести амплификацию по следующей программе:

«CFX96» (BioRad)	+94 °C	3 мин	40 циклов
	+94 °C	15 сек	
	+64 °C	40 сек (считывание)	

«ДТ96» (ДНК-технология)	+94 °C	3 мин	5 циклов
	+94 °C	15 сек	
	+64 °C	40 сек	35 циклов
	+94 °C	15 сек	
	+64 °C	40 сек (считывание)	

«LightCycler 96» (Roche)	+94 °C	180 сек	40 циклов
	+94 °C	10 сек	
	+62 °C	40 сек (считывание) (ramp rate 2,2 °C/сек)	

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определение генотипа образца проводится только в случае получения правильных значений Ct для образца для амплификационной смеси HBB.

Образец	Значения Ct (HBB)	
	Канал FAM	Канал HEX
ПКО	H3	< 25
ОКО	H3	H3
Исследуемый образец	H3	< 35

Примечание: H3 – нет значения (значение N/A или HД), KЦ – конечный цикл.

В случае получения невалидных значений Ct для амплификационной смеси HBB, образец считается непригодным для генотипирования. Требуется повтор анализа образца с этапа пробоподготовки.

«LightCycler 96» (Roche)

1. По окончании амплификации открыть файл завершеного анализируемого эксперимента в рабочей программе **LightCycler 96**.
2. Открыть вкладку **Analysis**. На панели инструментов кликнуть по значку **Add Analysis**, чтобы добавить новый анализ. Откроется диалоговое окно **Create New Analysis**.
3. Выбрать **Endpoint Genotyping**. Нажать ОК.
4. Во вкладке **Analysis** в соответствии с исходными настройками находятся четыре окна с результатами эксперимента.
5. Указать специфичные настройки в диалоговом окне **Endpoint Genotyping Settings** во вкладке **Parameters**:
 - **Pos/Neg Threshold**: 0,3
 - **Angle FAM**: 30 - 40
 - **Angle HEX**: 75 – 80
6. Программа автоматически интерпретирует результаты.

«CFX96» (BioRad)

1. Для каналов FAM и HEX выставить следующие настройки:
Cycles to Analyze 5-40
2. На вкладке **Allelic discrimination** в поле **Selected Fluorophores** назначить для аллели 1 канал HEX, для аллели 2 – канал FAM.
3. Программа автоматически интерпретирует результаты.

«DT96» (ДНК-технология)

1. Критерии положительного результата ПЦР 60%
2. Для каналов FAM и HEX выставить следующие настройки:
 - Канал HEX **Threshold** 20
 - Канал FAM **Threshold** 200
3. Программа автоматически интерпретирует результаты.

Проверить соответствие генотипов контрольных образцов заявленным:

Положительный контрольный образец 11 – Allele 1
Положительный контрольный образец 22 – Allele 2

По всем вопросам обращайтесь в офис компании ООО НПФ «Литех»:
телефон (495) 258-39-47, e-mail: info@lytech.ru



ПАМЯТКА ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА
ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНЕ HFE,
АССОЦИИРОВАННЫХ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ГЕМОХРОМАТОЗА,
МЕТОДОМ ПЦР

КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ
SNP-SHOT TwoStep-PB-96, 24 теста

ПРИНЦИП МЕТОДА

Система «SNP-SHOT» представляет собой комплект реагентов для выявления мутаций (полиморфизмов) в геноме человека.

В каждой реакционной смеси на полиморфизмы в гене HFE содержатся праймеры, необходимые для амплификации участка, содержащего полиморфизм, и два аллель-специфичных гидролизных зонда, содержащих полиморфный сайт. Зонд, содержащий полиморфизм Аллель 1, мечен флуорофором HEX, аллель 2 – флуорофором FAM. Дискриминация аллелей осуществляется за счёт различной эффективности разрушения Taq-полимеразой полностью и неполностью комплементарного зонда.

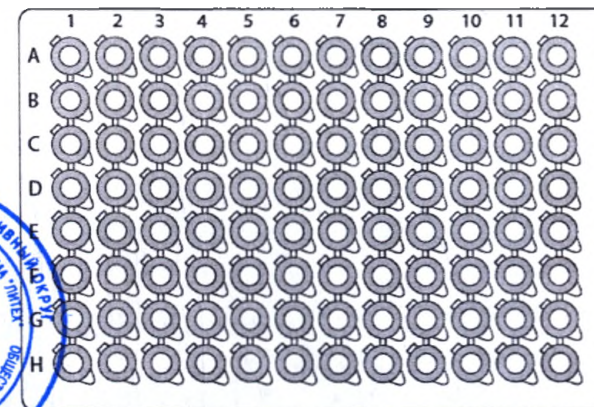
Результаты анализа позволяют дать **три типа заключений**:

гомозигота по аллелю 1; гетерозигота; гомозигота по аллелю 2.

В реакционной смеси HBB, предназначенной для контроля взятия материала, содержатся праймеры и гидролизный зонд, необходимые для амплификации и детекции участка b-глобина человека (HBB), что позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации: выявлять наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию, а также исключать из анализа пробы с недостаточным содержанием ДНК человека.

СОСТАВ НАБОРА

Набор состоит из 96 пробирок с реакционной смесью под слоем парафина, по 24 пробирки на каждую реакционную смесь. Один стрип предназначен для исследования двух клинических образцов на 3 полиморфизма и один контроль взятия материала. Пробирки с реакционной смесью на определенный полиморфизм расположены согласно приведенной ниже схеме:



- A. HFE His63Asp
- B. HFE Ser65Cys
- C. HFE Cys282Tyr
- D. HBB
- E. HFE His63Asp
- F. HFE Ser65Cys
- G. HFE Cys282Tyr
- H. HBB

«Утверждаю»
Подпись

ЛИТЕХ
Co. Ltd.
г. МОСКВА

Отдельно вложены пробирка с **раствором Taq-полимеразы**, пробирка с разбавителем, который используется в качестве единого **отрицательного контроля**, и пробирки с **положительными контрольными образцами** для всех реакционных смесей в отдельном пакете.

ВНИМАНИЕ! При работе с прибором **«LightCycler 96» (Roche)** следует проверить, что амплификационная смесь расфасована в **низкопрофильный пластик**.

ОБОЗНАЧЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ

Кат №	Ген	Аминокислотная замена	Нуклеотидная замена	SNP ID	Аллель	Каналы
t01191	HFE	His63Asp	C>G	rs1799945	(C) Аллель 1	HEX
					(G) Аллель 2	FAM
t01192	HFE	Ser65Cys	A>T	rs1800730	(A) Аллель 1	HEX
					(T) Аллель 2	FAM
t01193	HFE	Cys282Tyr	G>A	rs1800562	(G) Аллель 1	HEX
					(A) Аллель 2	FAM
t01136	HBB					HEX

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

1. Достать из коробки необходимое число пробирок (стрипов) и расставить в соответствии с заранее подготовленным протоколом. Маркировка пробирок не допустима.

2. Тщательно перемешать раствор Taq-полимеразы.

3. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по **5 мкл** раствора Taq-полимеразы.

4. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по **5 мкл**:

- в пробирки **исследуемых образцов** – исследуемые образцы ДНК;
- в пробирку **отрицательного контрольного образца** – разбавитель из комплекта набора;
- в пробирки **положительных контрольных образцов** – положительные контрольные образцы ДНК из комплекта используемого набора.

5. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 1500–3000 об/мин на плашечной центрифуге или на микроцентрифуге-вортексе.

6. Создать протокол расположения образцов.

1) При работе на приборе **«CFX 96» (BioRad)** положительные контрольные образцы и исследуемые образцы обозначить как **Unknown**, отрицательный контроль обозначить как **NTC**.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
для работы с прибором «CFX 96» (BioRad) создать следующий тест:

Тип: анализ полиморфизмов, 2 краски.

При необходимости назначить каналам FAM и HEX соответствующие аллели
Указать параметры анализа полиморфизмов:

- гетерозигота dCp < 3,0
- гомозигота dCp > 6,0

Для работы с наборами «SNP-SHOT» используются следующие каналы:

- канал HEX– АЛЛЕЛЬ 1
- канал FAM– АЛЛЕЛЬ 2

Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по заданному для образцов каналу.

7. Перенести пробирки в прибор и провести амплификацию по следующей программе:

«CFX96» (BioRad)	+80 °C	2 мин	
	+94 °C	3 мин	
	+94 °C	15 сек	40 циклов
	+64 °C	40 сек (считывание)	
«ДТ96» (ДНК-технология)	+80 °C	2 мин	
	+94 °C	3 мин	
	+94 °C	15 сек	5 циклов
	+64 °C	40 сек	
	+94 °C	15 сек	35 циклов
	+64 °C	40 сек (считывание)	
«LightCycler 96» (Roche)	+80 °C	120 сек	
	+94 °C	180 сек	
	+94 °C	10 сек	40 циклов
	+62 °C	40 сек (считывание) (ramp rate 2,2 °C/сек)	

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определение генотипа образца проводится только в случае получения правильных значений Ct для образца для реакционной смеси HBB.

Образец	Значения Ct (HBB)	
	Канал FAM	Канал HEX
ПКО	H3	< 25
ОКО	H3	H3
Исследуемый образец	H3	< 35

Примечание: H3 – нет значения (значение N/A или НД), КЦ – конечный цикл.

В случае получения невалидных значений Ct для реакционной смеси HBB, образец считается непригодным для генотипирования. Требуется повтор анализа образца с этапа пробоподготовки.

ПАСПОРТ № 01/111036/20

Калий хлористый (Кат. №111036)

Предприятие-изготовитель ООО «Биотехлит», 107023, г. Москва, ул. Малая Семеновская, д. 3А, стр.2
Тел. (495) 258 39 47

Номер серии: 01/111036/20 Дата изготовления: 01.2020 Годен до: 01.2027

Наименование	Описание	Фасовка
Калий хлористый	Белый кристаллический порошок с сероватым оттенком	1000 г

Не содержит легковоспламеняющихся, горючих, взрывоопасных и инфекционных веществ.

Результаты контроля:

Показатель	Спецификация	Результаты анализа
Стерильность	Должны отсутствовать микроорганизмы	Соответствует
Нуклеазная активность	Должна отсутствовать	Соответствует
Ингибирующие свойства	Должны отсутствовать при проведении ПЦР	Соответствует

Условия хранения: при комнатной температуре в сухом месте в течение всего срока годности.

Условия транспортировки: рекомендуется транспортировать при температуре его хранения.

Заключение:

Реагент годен для использования в молекулярно-генетических исследованиях.

Химик-технолог ООО «Биотехлит»

Н.В. Филиппова

Паспорт выдан: 26.01.2020г.



ПАСПОРТ № 09/111037/20

Магний хлористый 1М (Кат.№ 111037)

Предприятие-изготовитель ООО «Биотехлит», 107023, г. Москва, ул. Малая Семеновская, д. 3А, стр.2
Тел. (495) 258 39 47

Номер серии: 09/111037/20 Дата изготовления: 09.2020 Годен до: 09.2026

Продукт	Описание	Фасовка
Магний хлористый	Прозрачная жидкость без цвета и запаха	1М раствор 100 мл

Не содержит легковоспламеняющихся, горючих, взрывоопасных и инфекционных веществ.

Результаты контроля:

Показатель	Спецификация	Результаты анализа:
Стерильность	Должны отсутствовать микроорганизмы	Соответствует
Нуклеазная активность	Должна отсутствовать	Соответствует
Ингибирующие свойства	Должны отсутствовать при проведении ПЦР	Соответствует

Условия хранения: Хранить при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности.

Условия транспортировки: рекомендуется транспортировать при температуре его хранения.

Заключение:

Реагент годен для использования в молекулярно-генетических исследованиях.

Химик-технолог ООО «Биотехлит»



Н.В. Филиппова

Паспорт выдан: 25.09.2020г.

ПАСПОРТ № 03/111031/21

Трис (гидроксиметил) аминотан гидрохлорид (Кат.№ 111031)

Предприятие-изготовитель ООО «Биотехлит», 107023, г. Москва, ул. Малая Семеновская, д. 3А, стр.2
Тел. (495) 258 39 47

Номер серии: 03/111031/21

Дата изготовления: 03.2021

Годен до: 03.2024

Продукт	Описание	Фасовка
Трис (гидроксиметил) аминотан гидрохлорид	Кристаллический порошок белого цвета.	500 г

Не содержит легковоспламеняющихся, горючих, взрывоопасных и инфекционных веществ.

Результаты контроля:

Показатель	Спецификация	Результаты анализа:
pH 1М раствора в воде	4,2-5,0	4,3
Стерильность	Должны отсутствовать микроорганизмы	Соответствует
Нуклеазная активность	Должна отсутствовать	Соответствует
Ингибирующие свойства	Должны отсутствовать при проведении ПЦР	Соответствует

Условия хранения: при комнатной температуре в течение всего срока годности.

Условия транспортировки: рекомендуется транспортировать при температуре его хранения.

Заключение:

Реагент годен для использования в молекулярно-генетических исследованиях.

Химик-технолог ООО «Биотехлит»

Н.В. Филиппова

Паспорт выдан: 17.03.2021г.



ПАСПОРТ № 04/11300/22

Дезоксинуклеозидтрифосфат дАТФ (Кат.№ 113002)

Дезоксинуклеозидтрифосфат дГТФ (Кат.№ 113003)

Дезоксинуклеозидтрифосфат дЦТФ (Кат.№ 113004)

Дезоксинуклеозидтрифосфат дТТФ (Кат.№ 113005)

Предприятие-изготовитель ООО «Биотехлит», 107023, г. Москва, ул. Малая Семеновская, д. 3А, стр.2
Тел. (495) 258 39 47

Номер серии: 04/11300/22 Дата изготовления: 04.2022 Годен до: 10.2024

Продукт	Описание	Фасовка
Дезоксинуклеозидтрифосфат дАТФ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон – 150 мл
Дезоксинуклеозидтрифосфат дГТФ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон – 150 мл
Дезоксинуклеозидтрифосфат дЦТФ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон – 150 мл
Дезоксинуклеозидтрифосфат дТТФ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон – 150 мл

Не содержит легковоспламеняющихся, горючих, взрывоопасных и инфекционных веществ.

Результаты контроля:

Показатель	Спецификация	Результаты анализа:
Стерильность	Должны отсутствовать микроорганизмы	Соответствует
Нуклеазная активность	Должна отсутствовать	Соответствует
Ингибирующие свойства	Должны отсутствовать при проведении ПЦР	Соответствует

Условия хранения: при температуре -18...-20 °С в течение всего срока годности. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания

Условия транспортировки: рекомендуется транспортировать при температуре его хранения.

Заключение:

Реагент годен для использования в молекулярно-генетических исследованиях.

Химик-технолог ООО «Биотехлит»

Н.В. Филиппова

Паспорт выдан: 15.04.2022г.



ПАСПОРТ № 09/111013/21

Глицерин (Кат. № 111013)

Предприятие-изготовитель ООО «Биотехлит», 107023, г. Москва, ул. Малая Семеновская, д. 3А, стр.2
Тел. (495) 258 39 47

Номер серии: 09/111013/21 Дата изготовления: 09.2021 Годен до: 09.2024

Наименование	Описание	Фасовка
Глицерин	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 л жидкости в бутылке из темного стекла

Горючее и термически неустойчивое вещество, при длительном нагреве образует легковоспламеняющиеся токсичные вещества.

Результаты контроля:

Показатель	Спецификация	Результаты анализа
Стерильность	Должны отсутствовать микроорганизмы	Соответствует
Нуклеазная активность	Должна отсутствовать	Соответствует
Ингибирующие свойства	Должны отсутствовать при проведении ПЦР	Соответствует

Условия хранения: хранить в герметично закрытой стеклянной таре в сухом, прохладном, хорошо вентилируемом помещении. Избегать сильного нагрева, воздействия солнечных лучей и атмосферных осадков.

Условия транспортировки: рекомендуется транспортировать при комнатной температуре.

Заключение:

Реагент годен для использования в молекулярно-генетических исследованиях.

Химик-технолог ООО «Биотехлит» _____ Н.В. Филиппова

Паспорт выдан: 20.09.2021г.



ПАСПОРТ № 07/112003/22

Термостабильная Taq-полимераза (Кат № 112003)

Предприятие-изготовитель ООО «Биотехлит», 107023, г. Москва, ул. Малая Семеновская, д. 3А, стр.2
Тел. (495) 258 39 47

Номер сери: 07/112003/22

Дата изготовления: 07.2022

Годен до: 02.2024

Продукт	Описание	Фасовка
Термостабильная Taq-полимераза <i>Источник: Штамм E.coli, несущий рекомбинантный ген Taq полимеразы Thermus aquaticus.</i>	Прозрачная вязкая бесцветная жидкость	50 мл, активность 20 ед/мкл

Не содержит легковоспламеняющихся, горючих, взрывоопасных и инфекционных веществ.

Результаты проверки:

Показатель	Спецификация	Результаты анализа:
Стерильность	Должны отсутствовать микроорганизмы	Соответствует
Активность фермента	20 ед/мкл, не менее	20 ед/мкл
Эндонуклеазная активность	Должна отсутствовать	Соответствует
Экзонуклеазная активность	Должна отсутствовать	Соответствует

Условия хранения: хранить при температуре -18...-20°C в течение всего срока годности.

Условия транспортировки: рекомендуется транспортировать при температуре хранения с использованием хладагентов.

Заключение:

Реагент годен для использования в молекулярно-генетических исследованиях при соответствующей температуре хранения в течение срока годности.

Химик-технолог ООО «Биотехлит»

Н.В. Филиппова

Паспорт выдан: 08.07.2022 г.



ПАСПОРТ № 12/111019/20

Альбумин бычий сывороточный (Кат. №111019)

Предприятие-изготовитель ООО «Биотехлит», 107023, г. Москва, ул. Малая Семеновская, д. 3А, стр.2
Тел. (495) 258 39 47

Номер серии: 12/111019/20

Дата изготовления: 12.2020

Годен до: 12.2025

Продукт	Описание	Фасовка
Альбумин бычий сывороточный	Порошок от белого до желтого с желтовато-коричневым или зеленым оттенком	1 флакон – 50 г

Не содержит легковоспламеняющихся, горючих, взрывоопасных и инфекционных веществ.

Результаты контроля:

Показатель	Спецификация	Результаты анализа:
рН 2% раствора в воде	6,5-7,5	6,9, Соответствует
Стерильность	Должны отсутствовать микроорганизмы	Отсутствуют
Нуклеазная активность	Должна отсутствовать	Отсутствует
Ингибирующие свойства	Должны отсутствовать при проведении ПЦР	Отсутствуют

Условия хранения: при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности.

Условия транспортировки: рекомендуется транспортировать при температуре его хранения (+2...+8 °С). Допустима транспортировка при комнатной температуре.

Заключение:

Реагент годен для использования в ПЦР исследованиях.

Химик-технолог ООО «Биотехлит»

Н.В. Филиппова

Паспорт выдан: 08.12.2020 г.



ПАСПОРТ № 03/111056/21

Полиэтиленгликоль 6000 (Кат. №111056)

Предприятие-изготовитель ООО «Биотехлит», 107023, г. Москва, ул. Малая Семеновская, д. 3А, стр.2
Тел. (495) 258 39 47

Номер серии: 03/111056/21

Дата изготовления: 03.2021

Годен до: 03.2026

Продукт	Описание	Фасовка
Полиэтиленгликоль 6000	Воскообразные чешуйки белого цвета	1000 г

Не содержит легковоспламеняющихся, горючих, взрывоопасных и инфекционных веществ.

Результаты контроля:

Показатель	Спецификация	Результаты анализа:
pH 5 % раствора в воде	5,0-7,0	6,1 Соответствует
Стерильность	Должны отсутствовать микроорганизмы	Отсутствуют
Нуклеазная активность	Должна отсутствовать	Отсутствует
Ингибирующие свойства	Должны отсутствовать при проведении ПЦР	Отсутствуют

Условия хранения: при комнатной температуре в сухом темном месте в течение всего срока годности.

Условия транспортировки: рекомендуется транспортировать при температуре его хранения.

Заключение:

Реагент годен для использования, соответствует требованиям ТУ 2483-008-71150986-2006 изм. № 1-5.

Химик-технолог ООО «Биотехлит»

Н.В. Филиппова

Паспорт выдан: 19.03.2021 г.



ПАСПОРТ № 05/111040/20

Натриевая соль ЭДТА (Кат.№ 111040)

Предприятие-изготовитель ООО «Биотехлит», 107023, г. Москва, ул. Малая Семеновская, д. 3А, стр.2
Тел. (495) 258 39 47

Номер серии: 05/111040/20 Дата изготовления: 05.2020 Годен до: 03.2026

Продукт	Описание	Фасовка
Натриевая соль ЭДТА (соль динатриевая этилендиаминтетрауксус ной кислоты 2 –водная)	Белый кристаллический порошок или кристаллы белого цвета.	500 г

Не содержит легковоспламеняющихся, горючих, взрывоопасных и инфекционных веществ.

Результаты контроля:

Показатель	Спецификация	Результаты анализа:
рН 5% раствора в воде	4,0-6,0	4,4
Стерильность	Должны отсутствовать микроорганизмы	Соответствует
Нуклеазная активность	Должна отсутствовать	Соответствует
Ингибирующие свойства	Должны отсутствовать при проведении ПЦР	Соответствует

Условия хранения: при комнатной температуре в течение всего срока годности.

Условия транспортировки: рекомендуется транспортировать при температуре его хранения.

Заключение:

Реагент годен для использования в молекулярно-генетических исследованиях.

Химик-технолог ООО «Биотехлит» _____

Н.В. Филиппова

Паспорт выдан: 28.05.2020г.



ПАСПОРТ № 10/111025/21

Минеральное масло (Кат. №111025)

Предприятие-изготовитель ООО «Биотехлит», 107023, г. Москва, ул. Малая Семеновская, д. 3А, стр.2
Тел. (495) 258 39 47

Номер серии: 10/111025/21

Дата изготовления: 10.2021

Годен до: 10.2023

Продукт	Описание	Фасовка
Минеральное масло	Тягучая прозрачная жидкость	17 кг

Горючее и термически неустойчивое вещество.

Результаты контроля:

Показатель	Спецификация	Результаты анализа:
Стерильность	Должны отсутствовать микроорганизмы	Отсутствуют
Нуклеазная активность	Должна отсутствовать	Отсутствует
Ингибирующие свойства	Должны отсутствовать при проведении ПЦР	Отсутствуют

Условия хранения: при комнатной температуре в сухом темном месте в течение всего срока годности.

Условия транспортировки: рекомендуется транспортировать при температуре его хранения.

Заключение:

Реагент годен для использования в молекулярно-генетических исследованиях.

Химик-технолог ООО «Биотехлит»

Н.В. Филиппова

Паспорт выдан: 20.10.2021г.



Копия верна
Прошито, проверено,
скреплено печатью.
Количество листов
шт.
Директор
Наумов А.Ю.



ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №060922

Положительный контрольный образец ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11

Предприятие-изготовитель ООО НПФ «Литех», Москва 119435, ул. Малая Пироговская 1стр.3, тел. (495) 258-39-47

Номер серии 060922 Дата изготовления 06.09.2022 Годен до 06.09.2024

Контроль качества:

ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11 – смесь 4 плазмид со встроенной вставкой специфических фрагментов, соответствующих аллелю 1 полиморфизмов His63Asp, Cys282Tyr и Ser65Cys в гене *HFE* и фрагмента участка β-глобина человека (*HBB*), растворенных в разбавителе.

Ген	Полиморфизм	ДНК-мишень	Концентрация, ГЭ/мл		Значение Ct		Результат контроля
			Допустимый диапазон	Полученное значение*	Допустимый диапазон	Полученное значение**	
HFE	His63Asp	His (C)	$5 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	22 - 25	23,47	соответствует
HFE	Ser65Cys	Ser (A)	$1 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^5$	21 - 24	22,14	соответствует
HFE	Cys282Tyr	Cys (G)	$1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^6$	20 - 23	21,13	соответствует
HBB	-	-	$1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^6$	20 - 23	20,96	соответствует

* Среднее значение трех измерений, полученных в результате проверки;

** Среднее значение трех измерений, полученных в результате проверки на приборе CFX96.

Условия хранения:

ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11 должен храниться при температуре - 18... -20°C.

Заключение отдела контроля производства медицинских изделий:

ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11 соответствует требованиям СОП-ОКП-2.18.

Начальник отдела контроля производства медицинских изделий _____ (подпись)

Дата выдачи паспорта: «06» сентября 2022 г.



ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №060922
Положительный контрольный образец ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22

Предприятие-изготовитель ООО НПФ «Литех», Москва 119435, ул. Малая Пироговская 1 стр.3, тел. (495) 258-39-47

Номер серии 060922 Дата изготовления 06.09.2022 Годен до 06.09.2024

Контроль качества:

ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22– смесь 4 плазмид со встроенной вставкой специфических фрагментов, соответствующих аллелю 2 полиморфизмов His63Asp, Cys282Tyr и Ser65Cys в гене *HFE* и фрагмента участка β-глобина человека (*HBB*), растворенных в разбавителе.

Ген	Полиморфизм	ДНК-мишень	Концентрация, ГЭ/мл		Значение Ct		Результат контроля
			Допустимый диапазон	Полученное значение*	Допустимый диапазон	Полученное значение**	
HFE	His63Asp	(Asp)G	1*10 ⁶ - 1*10 ⁷	5*10 ⁶	22 - 25	23,13	соответствует
HFE	Ser65Cys	(Cys)T	1*10 ⁶ - 1*10 ⁷	5*10 ⁶	20 - 23	21,22	соответствует
HFE	Cys282Tyr	(Tyr)A	1*10 ⁶ - 1*10 ⁷	5*10 ⁶	20 - 23	21,57	соответствует
HBB	-	-	1*10 ⁶ - 1*10 ⁷	5*10 ⁶	20 - 23	21,08	соответствует

* Среднее значение трех измерений, полученных в результате проверки;

** Среднее значение трех измерений, полученных в результате проверки на приборе CFX96.

Условия хранения:

ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22 должен храниться при температуре - 18... -20°C.

Заключение отдела контроля производства медицинских изделий:

ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22 соответствует требованиям СОП-ОКП-2.18.

Начальник отдела контроля производства медицинских изделий _____ (подпись)

Дата выдачи паспорта: «06» сентября 2022 г.



ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №300822
Контрольный образец чувствительности КОЧ «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11

Предприятие-изготовитель ООО НПФ «Литех», Москва 119435, ул. Малая Пироговская 1стр.3, тел. (495) 258-39-47

Номер серии 300822 Дата изготовления 30.08.2022 Годен до 30.08.2023

Контроль качества:

Контрольный образец чувствительности КОЧ «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11 – раствор, содержащий 4 плазмиды со встроенной вставкой специфических фрагментов, соответствующих аллелю 1 полиморфизмов His63Asp, Cys282Tyr и Ser65Cys в гене HFE и фрагмента участка б-глобина человека (HBB), в концентрации 10^4 ГЭ/мл для каждого анализата (СОП-ПР-3.26, ООО НПФ «Литех»); применяется в приемно-сдаточных испытаниях для каждой серии набора.

Ген	Полимор-физм	ДНК-мишень	Концентрация, ГЭ/мл		Величина отклонения измеренной концентрации образца от заявленной		Коэффициент вариации значений концентрации образца		Результат контроля
			Допустимый диапазон	Полученное значение*	Допустимый диапазон	Полученное значение**	Допустимый диапазон	Полученное значение**	
HFE	His63Asp	His (C)	$9,0 \cdot 10^3 - 1,1 \cdot 10^4$	$1,02 \cdot 10^4$	90-110%	93-107%	0-10%	4,0%	соответст-вует
HFE	Ser65Cys	Ser (A)	$9,0 \cdot 10^3 - 1,1 \cdot 10^4$	$1,00 \cdot 10^4$	90-110%	95-108%	0-10%	2,9%	соответст-вует
HFE	Cys282Tyr	Cys (G)	$9,0 \cdot 10^3 - 1,1 \cdot 10^4$	$1,01 \cdot 10^4$	90-110%	94-107%	0-10%	3,7%	соответст-вует
HBB	-	-	$9,0 \cdot 10^3 - 1,1 \cdot 10^4$	$1,03 \cdot 10^4$	90-110%	93-105%	0-10%	3,3%	соответст-вует

* Среднее значение десяти измерений, полученных в результате проверки на приборе CFX96.

** Показатель рассчитан по результатам десяти измерений образца.

Условия хранения:

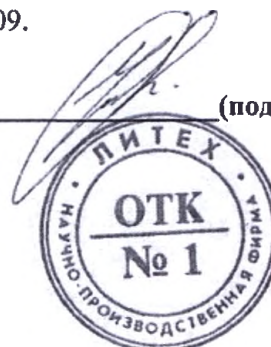
КОЧ «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11 должен храниться при температуре -18...-20 °С.

Заключение отдела контроля производства медицинских изделий:

КОЧ «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11 соответствует требованиям СОП-ОКП-4.09.

Начальник отдела контроля производства медицинских изделий _____ (подпись)

Дата выдачи паспорта: «30» августа 2022 г.





ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №300822
Контрольный образец чувствительности КОЧ «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22

Предприятие-изготовитель ООО НПФ «Литех», Москва 119435, ул. Малая Пироговская 1 стр.3, тел. (495) 258-39-47

Номер серии 300822 Дата изготовления 30.08.2022 Годен до 30.08.2023

Контроль качества:

Контрольный образец чувствительности КОЧ «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22 – раствор, содержащий 4 плазмиды со встроенной вставкой специфических фрагментов, соответствующих аллелю 2 полиморфизмов His63Asp, Cys282Tyr и Ser65Cys в гене HFE и фрагмента участка б-глобина человека (HBB), в концентрации 10^4 ГЭ/мл для каждого анализатора (СОП-ИР-3.26, ООО НПФ «Литех»); применяется в приемно-сдаточных испытаниях для каждой серии набора.

Ген	Полиморфизм	ДНК-мишень	Концентрация, ГЭ/мл		Величина отклонения измеренной концентрации образца от заявленной		Коэффициент вариации значений концентрации образца		Результат контроля
			Допустимый диапазон	Полученное значение*	Допустимый диапазон	Полученное значение**	Допустимый диапазон	Полученное значение**	
HFE	His63Asp	(Asp)G	$9,0 \cdot 10^3 - 1,1 \cdot 10^4$	$1,01 \cdot 10^4$	90-110%	92-106%	0-10%	3,1%	соответствует
HFE	Ser65Cys	(Cys)T	$9,0 \cdot 10^3 - 1,1 \cdot 10^4$	$1,03 \cdot 10^4$	90-110%	93-109%	0-10%	3,6%	соответствует
HFE	Cys282Tyr	(Tyr)A	$9,0 \cdot 10^3 - 1,1 \cdot 10^4$	$1,00 \cdot 10^4$	90-110%	95-108%	0-10%	2,2%	соответствует
HBB	-	-	$9,0 \cdot 10^3 - 1,1 \cdot 10^4$	$1,01 \cdot 10^4$	90-110%	91-107%	0-10%	2,9%	соответствует

* Среднее значение десяти измерений, полученных в результате проверки на приборе CFX96.

** Показатель рассчитан по результатам десяти измерений образца.

Условия хранения:

КОЧ «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22 должен храниться при температуре -18...-20 °С.

Заключение отдела контроля производства медицинских изделий:

КОЧ «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22 соответствует требованиям СОП-ОКП-4.09.

Начальник отдела контроля производства медицинских изделий _____ (подпись)

Дата выдачи паспорта: 30 августа 2022 г.



Разработал:	Согласовал:	Утвердил:
Начальник отдела исследований и разработок ООО НПФ «Литех»	Руководитель производственно-технического центра ООО НПФ «Литех»	Директор ООО НПФ «Литех»
Лисицына Е.С.	Шишова М.Ю.	Наумов А.Ю.
Подпись 	Подпись 	Подпись 
Дата 24.09.2021	Дата 24.09.2021	Дата 

Стандартная операционная процедура

«Приготовление положительных контролей для наборов SNP-SHOT»

1. Введение.

Данный регламент описывает процедуру приготовления положительных контролей (положительных контрольных образцов) для наборов формата SNP-SHOT (далее ПКО).

2. Применение.

Настоящая СОП используется технологами производства при приготовлении каждой новой серии ПКО, для обучения новых сотрудников.

3. Термины, сокращения и условные обозначения.

СОП	- стандартная операционная процедура
ОКП	- отдел контроля производства медицинских изделий
ПР	- производство
ПР*	- промежуточное разведение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ЗФ	- заправляемая форма
Ф	- формуляр
МИ	- методологическая инструкция
И-ОР	- инструкция организации работ
СМК	- система менеджмента качества

4. Персонал.

- Технолог производства.

5. Материалы и реагенты.

- Плазмидный образец, по СОП-ОИР-1.01;
- 1-кратный ТЕ-буфер, по СОП-ПР-4.08;
- 1 лицерин, «Merck»;
- Раствор дезинфицирующий для обработки поверхностей «Бриллиант», ООО Центр Профилактики "ГИГИЕНА-МЕД";
- Салфетки для обработки поверхностей «Спанлейс» или аналогичные;
- Перчатки одноразовые без талька «Dr.Klauss», «NitreMAX» XS, S или аналогичные;
- Наконечники одноразовые с фильтром до 1000 мкл, до 100 мкл, до 10 мкл, «OmniTip»;
- Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом 0,6 мл, «Axygen»;
- Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом 1,5 мл, «SSI»;
- Пробирки винтовые объемом 5 мл, градуированные, с коническим дном и юбкой устойчивости, «Axygen Scientific Inc»;
- Штатив для микропробирок объемом 1,5-2,0 мл, количество лунок 80, «Хеликон»;
- Штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,6 мл, «Хеликон».

6. Оборудование

- Дозаторы механические на 0,5 – 10 мкл (или 2-20 мкл), 40-200 мкл (или 20-200 мкл), 5-50 мкл (или 5-40 мкл), 100 – 1000 мкл «Ленпинет»;
- ПЦР-бокс БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы»;
- Центрифуга-вортекс Микроспин FV-2400, 2800 об/мин, Biosan.

7. Процедура.

7.1. Общие положения.

- 7.1.1. ПКО представляет собой смеси калибраторов (плазмид со специфической вставкой, соответствующих аллелям полиморфизмов генов). Концентрация каждого калибратора прописана в *Ф-1 СОП-ПР-3.05 «Список компонентов ПКО и их концентрация»*.
- 7.1.2. Степень разведения стока каждого вида и серии плазмиды рассчитывается, исходя из ее начальной концентрации, указанной в *3Ф-4 МИ-СМК-17 «Паспорт на плазмиду»* для каждого вида и каждой серии плазмид.
- 7.1.3. Приготовление ПКО осуществляется путем смешивания промежуточных разведений (ПР*) стоков плазмид, входящих в состав ПКО. ПР* плазмид могут готовиться в объеме большем, чем необходимо для приготовления новой серии ПКО.
- 7.1.4. Каждому ПР* плазмиды присваивается своя серия и указывается значение степени разведения.
- 7.1.5. Допустимо приготовление ПКО из ранее приготовленных ПР* стоков плазмид.

7.2. Подготовка к процедуре.

- 7.2.1. Определить концентрацию стоковых плазмид, входящих в состав ПКО. Концентрации стоков плазмид указаны в соответствующих *3Ф-4 МИ-СМК-17*.
- 7.2.2. Определить концентрацию соответствующих калибраторов в составе ПКО. Концентрации указаны в *Ф-1 СОП-ПР-3.05 «Список компонентов ПКО и их концентрация»*.
- 7.2.3. Рассчитать степень разведения плазмид до необходимых концентраций с учетом разведения последнего ПР* плазмид при итоговом смешивании компонентов в ПКО. Последнее ПР* плазмид планируется с расчетной концентрацией ДНК-матриц в диапазоне от 10^7 до 10^5 ГЭ/мл каждой.
- 7.2.4. Рассчитать количество и объем необходимых ПР* плазмид, а также необходимые объемы 1-кратного ГЕ-буфера для разведения плазмид. Все разведения делать путем последовательных титровок, соблюдая следующие правила:
- однократное разведение образца должно производиться не более, чем в 10 раз,
 - минимальный объем аликвоты, отбираемой для разведения, составляет 5 мкл.

7.3. Процедура приготовления Положительного контроля.

- 7.3.1. Подготовить рабочее место по И-ОР-04 «Инструкция по подготовке рабочего места».
- 7.3.2. Выставить в штатив «рабочее место» необходимое количество пробирок объемом 0,6 мл или 1,5 мл (в зависимости от требуемого объема приготавливаемых ПР* и ПКО).

Если ПКО готовится в объеме более 1,5 мл, использовать для приготовления пробирку объемом 5 мл.

- 7.3.3. Добавить в каждую пробирку рассчитанное ранее количество ТЕ-буфера. Закрыть пробирки и подписать степень разведения от стока получаемого образца ПР*. Все разведения плазмид проводятся в 1-кратном ТЕ буфере. Последнее ПР* для ПКО проводится в 1-кратном ТЕ, содержащем 10% глицерина.
- 7.3.4. Отобрать из пробирки со стоком плазмиды рассчитанную ранее аликвоту образца и перенести в пробирку, подписанную как первое разведение («-1»). Закрыть пробирку, тщательно перемешать содержимое на вортексе и сбросить капли кратковременным центрифугированием.
- 7.3.5. Отобрать из пробирки «-1» рассчитанную ранее аликвоту полученного ПР* и перенести в пробирку, подписанную как второе разведение («-2»). Закрыть пробирку, тщательно перемешать содержимое на вортексе и сбросить капли кратковременным центрифугированием.
- 7.3.6. Повторить пункт 7.3.5. для всех последующих разведений.

Пример приготовления ПКО для калибратора N из стока плазмиды N.

Концентрация стока плазмиды N – $1,0 \cdot 10^{11}$ ГЭ/мл согласно 3Ф-4 МИ-СМК-17 «Паспорт на плазмиду».

Требуемая концентрация калибратора N – $4 \cdot 10^5$ ГЭ/мл согласно Ф-1 СОП-ПР-3.05 «Список компонентов ПКО и их концентрация».

Кратность разведения калибратора N в ПКО составляет 8, следовательно, требуемая концентрация последнего ПР* плазмиды N должна быть $3,2 \cdot 10^6$ ГЭ/мл. Степень разведения стока плазмиды равна 4 порядкам. Приготовление последнего ПР* плазмиды следует делать путем 10-кратного последовательного разведения стока в 4 этапа.

Для приготовления 1,0 мл последнего ПР* плазмиды N можно использовать следующую схему разведений:

Таблица 1

Степень разведения от стока плазмиды /обозначение полученного ПР*	Количество 1-кратного ТЕ буфера, мкл	Количество образца, мкл /наименование образца	Полученная концентрация (теоретическая), ГЭ/мл
10 раз / «-1»	180	20 / «сток плазмиды»	$1,0 \cdot 10^{10}$
100 раз / «-2»	180	20 / «-1»	$1,0 \cdot 10^9$
1000 раз / «-3»	360	40 / «-2»	$1,0 \cdot 10^8$
31000 раз / «-4»	680	320 / «-3»	$3,2 \cdot 10^6$

Для приготовления 1,0 мл ПКО можно использовать следующую схему:

Таблица 2

Наименование компонента	Количество компонента, мкл	Полученная концентрация (теоретическая), ГЭ/мл
последнее ПР* плазмиды N	125	$4 \cdot 10^5$

последние ПР* прочих 7 плазмид	по 125	концентрация последнего ПР*/8
-----------------------------------	--------	----------------------------------

- 7.3.7. Добавить в пробирку для ПКО необходимое количество последних ПР* всех образцов плазмид, входящих в состав ПКО, согласно Ф-1 СОП-ПР-3.05 «Список компонентов ПКО и их концентрация».
- 7.3.8. Тщательно перемешать на вортексе содержимое пробирки и сбросить капли кратковременным центрифугированием. Перемешивание в пробирке объемом 5 мл проводить путем переворачивания не менее 30 раз на 180 градусов. Пробирка маркируется этикеткой с указанием наименования, серии, даты изготовления и срока годности реагента.
- 7.3.9. В пробирку объемом 0,6 мл отобрать 100 мкл приготовленного ПКО и передать сотрудникам ОКП для проверки качества и определения концентрации калибраторов, входящих в состав ПКО.
- 7.3.10. Приготовленный ПКО маркируется желтой биркой, означающей статус «Карантин», и переносится в зону «Карантин» (хранение при температуре -18...-20 °C).
- 7.3.11. После получения разрешения на использование ПКО в виде подписанной 3Ф-1 СОП-ПР-3.05 «Протокол приготовления и проверки положительных контролей для наборов SNP-SHOT» указать полученные значения концентраций калибраторов на этикетке реагента.
- 7.3.12. Пробирка с ПКО маркируется зеленой биркой, означающей статус «Годен», и переносится в зону «Готов» на хранение при температуре -18...-20 °C.
- 7.3.13. Присвоить ПКО срок годности – 5 лет от даты приготовления.
- 7.3.14. При необходимости аликвотировать ПКО, маркировать каждую аликвоту этикеткой с указанием номера аликвоты, наименования, серии, даты изготовления и срока годности реагента. Копию полученного от специалистов ОКП паспорта качества ПКО прикрепить к 3Ф-1 СОП-ПР-3.05 «Протокол приготовления и проверки положительных контролей для наборов SNP-SHOT».
- 7.3.15. При получении неудовлетворительных результатов проверки образец ПКО промаркировать красной биркой, означающей статус «Брак» и переместить в зону «Брак». Реагент несоответствующего качества управляется согласно МИ-СМК-08 «Управление несоответствующей продукцией».

8. Создаваемые записи.

3Ф-1 СОП-ПР-3.05 «Протокол приготовления и проверки положительных контролей для наборов SNP-SHOT».

9. Ссылки.

МИ-СМК-08. ООО НПФ «Литех»	Управление несоответствующей продукцией
МИ-СМК-17. ООО НПФ «Литех»	Порядок приема новой продукции к производству и внесения изменений в существующую продукцию
И-ОР-04. ООО НПФ «Литех»	Инструкция по подготовке рабочего места
СОП-ПР-4.08. ООО НПФ «Литех»	Приготовление растворов ТЕ различной концентрации
СОП-ОИР-1.01. ООО НПФ «Литех»	Создание рекомбинантных генно-инженерных конструкций

Ф-1 СОП-ПР-3.05, ООО НПФ «Литех»	Список компонентов ПКО и их концентрация
----------------------------------	--

10. Приложения.

Приложение 1	- Лист рассылки СОП-ПР-3.05	1 лист
Приложение 2	- Лист ознакомления с СОП-ПР-3.05	1 лист
Приложение 3	- Лист согласования СОП-ПР-3.05	1 лист

Лист рассылки СОП-ПР-3.05

Номер копии	Должность, Ф.И.О.	Дата получения	Подпись	Сдача устаревшей версии, дата/подпись

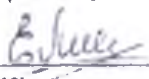
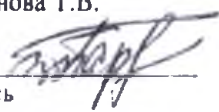
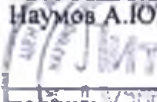
Лист ознакомления с СОП-ПР-3.05

[illegible]

Приложение 3

Лист согласования СОП-ПР-3.05

[illegible]

ООО НПФ «Литех»		
Вид документа: Стандартная операционная процедура		Код документа: СОП-ПР-3.26
Наименование: Регламент приготовления КОЧ		Версия №170920
Разработал Начальник отдела исследований и разработок ООО НПФ «Литех»	Согласовал Руководитель производственно- технического центра ООО НПФ «Литех»	Утвердил Директор ООО НПФ «Литех»
Лисицына Е.С.  подпись	Парфенова Т.В.  подпись	Наумов А.Ю.  подпись
дата	дата	дата

Стандартная операционная процедура

«Регламент приготовления контрольного образца чувствительности (КОЧ)»

1. Введение

Данный регламент описывает процедуру приготовления контрольного образца чувствительности (далее – КОЧ).

2. Применение

Регламент используется технологом производства для приготовления каждой новой серии КОЧ.

3. Персонал

Технолог производства.

4. Термины, сокращения и условные обозначения

СОП	- стандартная операционная процедура
ОКП	- отдел контроля производства медицинских изделий
КОЧ	- контрольный образец чувствительности
ПР	- промежуточное разведение
КО	- контрольный образец
ЗФ	- заполняемая форма

5. Материалы и реагенты

Плазмидный образец, приготовленный по СОП-ПР-3.12 ООО НПФ «Литех»;
Образец геномной ДНК микроорганизма, по СОП-ПР-3.10 ООО НПФ «Литех»;
Образец геномной РНК микроорганизма, по СОП-ПР-3.10 ООО НПФ «Литех»;
ТЕ-буфер, по СОП-ПР-4.08 ООО НПФ «Литех»;
Раствор ЭКС, по СОП-ПР-2.67 ООО НПФ «Литех»;
Наконечники с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл, Omnitip;
Пробирки полипропиленовые объемом 1,5 мл, 2,0 мл и 5,0 мл, SSI;
Салфетки для обработки поверхностей;
Раствор дезинфицирующий для обработки поверхностей;
Перчатки одноразовые без талька «Matrix» S,M.

6. Оборудование

БАВ-ПЦР-"Ламинар-С", Lamsystems;
Дозаторы автоматические до 40, 200 и до 1000 мкл, Ленпипет;
Миницентрифуга-вортекс Микроспин, Biosan.

Примечание.

7. Процедура приготовления КОЧ

7.1. Общие положения

Все процедуры проводить в ПЦР-боксе, в халате и одноразовых перчатках.

Для каждого вида КОЧ определен его состав, концентрация и буфер для разведения, указанные в Ф-1 СОП-ПР-3.26 «Список КОЧ и их концентрации». Степень разведения стока каждого вида и серии геномной РНК, ДНК или плазмиды рассчитывается, исходя из ее концентрации, указанной в паспорте на сток определенной серии.

Приготовление КОЧ осуществляют путем последовательных десятикратных разведений стока геномной РНК, ДНК или плазмиды. Промежуточные разведения (ПР) могут готовиться в объеме большем, чем необходимо для приготовления КОЧ. Каждому ПР присваивается своя серия и обозначение степени разведения. Условия хранения ПР аналогичны условиям хранения стока геномной РНК, ДНК или плазмиды.

Допустимо приготовление образца КОЧ из приготовленных ПР плазмидного стока.

7.2. Подготовка к процедуре

7.2.1. Определить концентрацию соответствующего образца стока геномной РНК, ДНК или плазмиды. Концентрация указана в паспорте стока геномной РНК, ДНК или плазмиды.

7.2.2. Определить требуемую концентрацию КОЧ, руководствуясь Ф-1 СОП-ПР-3.26 «Список КОЧ и их концентрации».

7.2.3. Рассчитать степень разведения геномной РНК, ДНК или плазмиды до необходимой концентрации КОЧ. Рассчитать количество и объем необходимых промежуточных разведений геномной РНК, ДНК или плазмиды.

7.3. Процедура приготовления

7.3.1. Подготовить рабочее место по И-ОР-04 «Инструкция по подготовке рабочего места».

7.3.2. Выставить в штатив рабочее место необходимое количество пробирок на 1,5 мл или более в зависимости от объема приготавливаемых ПР и КОЧ.

7.3.3. Добавить в каждую пробирку необходимое количество буфера для разведения. Закрыть пробирки и подписать степень разведения от стока получаемого образца ПР. Последнее, заранее рассчитанное, разведение обозначить как КОЧ.

7.3.4. Отобрать из стока геномной РНК, ДНК или плазмиды необходимое количество

образца и перенести в пробирку, подписанную как первое разведение. Тщательно перемешать на вортексе и сбросить капли кратковременным центрифугированием на вортексе.

7.3.5. Повторить пункт 7.2.4 для последующих разведений необходимое число раз (см. пример разведения ниже). Перемешивание в пробирке объемом 5 мл проводить путем переворачивания не менее 30 раз.

Пример приготовления КОЧ-N из стока плазмиды N:

По паспорту на плазмидный сток определена его концентрация – 10^9 гз/мл. По Ф-1 СОП-ПР-3.26 «Список КОЧ и их концентрации» определена требуемая концентрация КОЧ-N – 10^4 гз/мл. Степень разведения стока плазмиды равна 5 порядкам. По Ф-1 СОП-ПР-3.26 «Список КОЧ и их концентрации» определен буфер для разведения – ТЕ-буфер. Разведение следует делать путем 10-кратного последовательного разведения в 3 этапа.

Степень разведения от стока плазмиды/обозначение полученного ПР	Количество ТЕ, мл	Количество образца, мл	Полученная концентрация (теоретически)
10 раз («-1»)	0,18	0,02 мл стока плазмиды	10^8 гз/мл
100 раз («-2»)	0,9	0,1 мл образца «-1»	10^7 гз/мл
1000 раз («-3»)	0,9	0,1 мл образца «-2»	10^6 гз/мл
10000 раз («-4»)	0,9	0,1 мл образца «-3»	10^5 гз/мл
КОЧ	0,9	0,1 мл образца «-4»	10^4 гз/мл

Оставшийся объем ПР с концентрацией 10^5 гз/мл – 10^8 гз/мл можно использовать для приготовления последующих серий КОЧ.

7.3.6. Из полученного образца КОЧ отобрать не менее 100 мкл для проверки качества и определения его концентрации. Образец КОЧ маркировать желтой биркой и хранить при температуре $-18...-20$ °C в зоне «Карантин».

7.3.7. После получения разрешения на использование КОЧ в виде подписанной 3Ф-1 СОП-ПР-3.26 «Протокол приготовления и проверки контрольного образца чувствительности» внести полученную в процессе тестирования концентрацию на этикетку образца. Заменить желтую бирку зеленой и перенести образец в зону «Готов» на хранение при температуре $-18...-20$ °C.

7.3.8. Присвоить КОЧ срок годности - 1 год от даты приготовления.

7.3.9. При необходимости аликвотировать образец КОЧ, маркировать каждую аликвоту этикеткой с указанием номера аликвоты, наименования, серии, даты изготовления и срока годности реагента. Копию полученного от специалистов ОКП паспорта качества КОЧ прикрепить к ЗФ-1 СОП-ПР-3.26 «Протокол приготовления и проверки контрольного образца чувствительности».

7.3.10. При получении неудовлетворительных результатов проверки образец КОЧ промаркировать красной биркой и переместить в зону «Брак». Дальнейшее управление образцом осуществлять согласно МИ-СМК-08.

8. Создаваемые записи

Процесс приготовления каждой серии КОЧ и аликвотирования (при необходимости) регистрируется в ЗФ-1 СОП-ПР-3.26 «Протокол приготовления и проверки контрольного образца чувствительности».

9. Ссылки на регламентирующие и создаваемые документы СМК

МИ-СМК-08 «Управление несоответствующей продукцией»;

СОП-ПР-3.12 «Получение рекомбинантных плазмид на основе вектора pGEM»;

СОП-ПР-4.08 «Приготовление растворов ТЕ различной концентрации»;

СОП-ПР-2.67 «Приготовление водно-солевого буфера со стабилизатором РНК»;

СОП-ПР-3.10 «Регламент получения образца геномной РНК и ДНК»;

И-ОР-04 «Инструкция по подготовке рабочего места»;

ЗФ-1 СОП-ПР-3.26 "Протокол приготовления и проверки контрольного образца чувствительности";

Ф-1 СОП-ПР-3.26 «Список КОЧ и их концентрации».

10. Приложения

Приложение 1	Лист рассылки СОП-ПР-3.26	1 лист
Приложение 2	Лист ознакомления СОП-ПР-3.26	1 лист
Приложение 3	Лист согласования СОП-ПР-3.26	1 лист

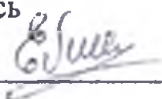
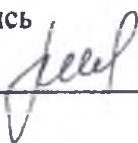
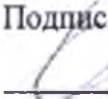
Приложение 1

Лист рассылки СОП-ПР-3.26

Номер копии	Должность, Ф.И.О.	Дата получения	Подпись	Сдача устаревшей версии, дата/подпись

Лист согласования СОП-ПР-3.26

[illegible]

Разработал:	Согласовал:	Утвердил:
Начальник отдела исследований и разработок ООО НПФ «Литех»	Руководитель производственно-технического центра ООО НПФ «Литех»	Директор ООО НПФ «Литех»
Лисицына Е.С.	Шишова М.Ю.	Наумов А.Ю.
Подпись 	Подпись 	Подпись 
Дата <u>22.09.2021</u>	Дата <u>22.09.2021</u>	Дата <u>22.09.2021</u>



Стандартная операционная процедура «Внутренний контроль качества положительных контролей для наборов SNP-SHOT»

1. Введение.

Данный регламент описывает порядок проведения внутреннего контроля качества положительных контролей (положительных контрольных образцов) для наборов SNP-SHOT (далее ПКО).

2. Применение.

Настоящая СОП используется специалистами отдела контроля производства при проверке качества каждой приготовленной серии ПКО, для обучения новых сотрудников.

3. Термины, сокращения и условные обозначения.

СОП	- стандартная операционная процедура
ОКП	- отдел контроля производства медицинских изделий
КОП	- контрольный образец предприятия
КО	- контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПР	- производство
ЗФ	- заполняемая форма
Ф	- формуляр
МИ	- методологическая инструкция
СМК	- система менеджмента качества
И-ОР	- инструкция организации работ

4. Персонал.

Специалист ОКП.

5. Материалы и реагенты.

- ПКО, подлежащий проверке;
- Образцы КОП, соответствующие ПКО, по СОП-ПР-3.05;
- ТЕ-буфер, по СОП-ПР-4.08;
- Набор реагентов для проведения ПЦР-анализа соответствующего ПКО;
- Раствор дезинфицирующий для обработки поверхностей «Бриллиант», ООО Центр Профилактики «ГИГИЕНА-МЕД»;
- Салфетки универсальные, например, "Чудо-тряпка", "Bagi";
- Перчатки одноразовые без талька «Dr.Klauss», «NitriMAX» XS, S или аналогичные;
- Наконечники одноразовые с фильтром до 1000 мкл, до 100 мкл, до 10 мкл, «Omnitip»;
- Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом 0,6 мл, «Ахуген»;
- Микроцентрифужные пробирки, градуированные объемом 1,5 мл, «SSI»;
- Стрипованные пробирки полипропиленовые объемом 0,2 мл с оптической крышкой, «SSI»;
- Штатив для микропробирок 1,5-2,0 мл, количество лунок 80, «Хеликон»;
- Штатив «рабочее место» для пробирок 0,5 мл, «Хеликон».

6. Оборудование

- Дозаторы механические на 0,5 – 10 мкл (или 2-20 мкл), 40-200 мкл (или 20-200 мкл), 5-50 мкл (или 5-40 мкл), 100 – 1000 мкл, «Ленпипет»;
- ПЦР-бокс БАВ-ПЦР-"Ламинар-С", ЗАО «Ламинарные системы»;
- Амплификатор с детекцией в режиме «реального времени» CFX96 (Bio-Rad, США);
- Центрифуга-вортекс Микроспин FV-2400, 2800 об/мин, Biosan.

7. Процедура

7.1. Общие положения и схема проверки.

Все процедуры проводить в ПЦР-боксе, в халате и одноразовых перчатках.

- 7.1.1. Валидация ПКО проводится посредством ПЦР анализа с детекцией результатов в режиме «реального времени» с помощью соответствующего набора реагентов (указан в *Ф-1 СОП-ОКП-2.18 «Список ПЦР-наборов, предназначенных для контроля ПКО»*).
- 7.1.2. Определение количественных характеристик калибраторов, входящих в состав ПКО, проводится с использованием соответствующей серии контрольных образцов (КО), приготовленных из рабочих калибраторов - контрольных образцов предприятия (КОП). На основании результатов амплификации программа автоматически строит калибровочную прямую и определяет концентрацию образца. Итоговое значение концентрации калибраторов, входящих в состав ПКО, рассчитывается как среднее арифметическое значение концентраций калибраторов, полученных при проведении серии из 3 независимых измерений для каждого калибратора.

Смешивание компонентов, постановку ПЦР (осуществляется в «Условно грязной» зоне согласно И-ОР-01) и анализ результатов проводить согласно инструкции к используемому набору.

7.2. Подготовка к контролю качества.

- 7.2.1. Определить концентрацию необходимых для контроля КО (указаны в *Ф-1 СОП-ОКП-4.04 «Рабочие концентрации КОП и КО, используемые для проведения выходного контроля наборов реагентов»*).
- 7.2.2. Рассчитать степень разведения КОП для приготовления соответствующих КО. Разведения КОП делать путем последовательных титровок, соблюдая следующие правила:
- единократное разведение образца должно производиться не более, чем в 10 раз;
 - минимальный объем аликвоты, отбираемой для разведения, составляет 5 мкл.
- 7.2.3. Подготовить ПЦР-бокс к работе согласно И-ОР-04, внести реагенты в бокс.
- 7.2.4. Выставить в штатив рабочее место необходимое количество пробирок объемом 0,6 мл.
- 7.2.5. Добавить в каждую пробирку рассчитанное количество 1-кратного ТЕ-буфера для получения рабочих концентраций соответствующих КО. Закрыть пробирки, открутить на вортексе в течение 2-3 секунд для сброса капель. Подписать наименование и расчетную концентрацию получаемого образца.
- 7.2.6. Образец КОП разморозить и тщательно перемешать вортексированием. Отобрать из образца КОП объем аликвоты, обеспечивающий требуемое разведение до КО1, и перенести в соответствующую пробирку. Тщательно перемешать на вортексе и сбросить капли кратковременным центрифугированием.

- 7.2.7. Повторить пункт 7.2.6 для последующих разведений необходимое число раз (см. пример разведения в Таблице 1). Допустимо пропорциональное увеличение или уменьшение объемов ТЕ-буфера и вносимых контрольных образцов, с учетом требований п.7.2.2.
- 7.2.8. Допустимо хранение серии образцов КО при температуре $-18...-20^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев. Предельный образец КО не подлежит хранению и повторному анализу, сразу после использования утилизируется без оформления протоколов утилизации. При необходимости проведения повторного анализа или проведения последующего планового контроля с использованием готовой серии КО, предельный образец КО готовится из более концентрированного образца КО той серии, которая используется для текущего контроля (см. пример разведения в Таблице 1).

Пример разведения КОП N 10^8 для получения серии КО:

А. Согласно СОП-ОКП-4.04 определена концентрация КОП N 10^8 равная 10^8 ГЭ/мл, определены требуемые контрольные образцы и их концентрации: КО1 ($2 \cdot 10^7$ ГЭ/мл), КО2 ($2 \cdot 10^6$ ГЭ/мл), КО3 ($2 \cdot 10^5$ ГЭ/мл), КО4 ($2 \cdot 10^4$ ГЭ/мл), КО5 ($2 \cdot 10^3$ ГЭ/мл).

Б. Для приготовления серии КО необходимо выполнить одно 5-кратное разведение КОП для получения КО1 и четыре 10-кратных разведения для получения КО2, КО3, КО4 и КО5.

В. Выставить в штатив 5 пробирок объемом 0,6 мл и подписать наименование и расчетную концентрацию получаемого образца.

Таблица 1

Образец	КО1	КО2	КО3	КО4	КО5
Кратность разведения	5	10	10	10	10
Объем 1-кратный ТЕ, мкл	80	90	90	90	90
Объем предыдущего разведения, мкл	20	10	10	10	10
Полученный объем, мкл	100	100	100	100	100
Полученная концентрация, ГЭ/мл	$2 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$

Г. Добавить во все пробирки указанное в таблице количество 1-кратного ТЕ-буфера.

Д. Отобрать из образца КОП N 10^8 аликвоту указанного в таблице объема, добавить в первую пробирку. Тщательно перемешать на вортексе и сбросить капли кратковременным центрифугированием.

Е. Повторить пункт «Д» для всех оставшихся пробирок, количество вносимого образца предыдущего разведения указано в таблице.

Ж. Сразу после приготовления провести процедуру валидации ПКО.

7.3. Порядок проверки Положительного контроля.

Постановку реакции амплификации проводить в ПЦР-боксе, в халате и одноразовых перчатках.

7.3.1. Подготовить ПЦР-бокс к работе согласно И-ОР-04, внести реагенты в бокс.

7.3.2. Провести постановку ПЦР-анализа ПКО с помощью соответствующего набора реагентов согласно инструкции производителя (указан в Ф-1 СОП-ОКП-2.18 «Список ПЦР-наборов, предназначенных для контроля ПКО»).

7.3.3. Анализ ПКО проводится в трех повторностях для каждого калибратора, входящего в состав ПКО.

- 7.3.4. Одновременно с ПКО проводится анализ серии образцов КО, соответствующих исследуемому калибратору (из п.7.2).
- 7.3.5. Провести амплификацию в приборе CFX96 (Bio-Rad, США), используя программу амплификации и настройки каналов флуоресценции, указанные в инструкции к набору. Образцы КО указать как стандарты и присвоить им соответствующую концентрацию.

Пример постановки ПЦР ПКО для анализа калибратора N.

А. Согласно СОП-ОКП-4.04 определены требуемые КО и их концентрации: КО1 ($1 \cdot 10^7$ ГЭ/мл), КО2 ($1 \cdot 10^6$ ГЭ /мл), КО3 ($1 \cdot 10^5$ ГЭ /мл), КО4 ($1 \cdot 10^4$ ГЭ /мл).

Б. Для анализа калибратора N используется набор, указанный *Ф-1 СОП-ОКП-2.18 «Список ПЦР-наборов, предназначенных для контроля ПКО»*.

В. Для определения количественных характеристик калибратора N используют следующие КО: КО1, КО2, КО3, КО4.

В таблице указаны все образцы, для которых необходимо провести реакцию амплификации.

Наименование образца	Повторности
Исследуемый ПКО	3
КО1	1
КО2	1
КО3	1
КО4	1
ПКО из набора	1
Отрицательный контроль	1

- 7.3.6. После окончания программы амплификации провести анализ полученных результатов, используя программное обеспечение компании Bio-Rad, установив настройки для анализа кривых накопления согласно инструкции к набору.

7.4. Валидация Положительного контроля.

- 7.4.1. После выставления настроек для анализа соответствующего калибратора, входящего в состав ПКО, программа автоматически рассчитает концентрацию образца калибратора в ПКО и отобразит цикл пересечения с пороговой линией C_t для каждой из 3 повторностей.

- 7.4.2. Провести оценку соответствия характеристик калибраторов в составе ПКО всем критериям, указанным в *Ф-2 СОП-ОКП-2.18 «Критерии оценки качества ПКО»* для всех повторностей.

- 7.4.3. Провести оценку качественного состава ПКО согласно *Ф-1 СОП-ПР-3.05 «Список компонентов ПКО и их концентрация»*:

- ПКО должен содержать все калибраторы, указанные в *Ф-1 СОП-ПР-3.05*.

- 7.4.4. ПКО считается пригодным, если выполняются требования пунктов 7.4.2 и 7.4.3.

В случае получения неудовлетворительных результатов процедуру проверки ПКО требуется повторить.

При повторном получении неудовлетворительных результатов проверки ПКО признается непригодным и запрещается для использования, в *3Ф-1 МИ-СМК-8*

«Протокол несоответствия» вносится соответствующая запись. Пробирка с ПКО маркируется красной биркой, означающей статус «Брак», и переносится в зону «Брак». Реагент несоответствующего качества управляется согласно МИ-СМК-08 «Управление несоответствующей продукцией».

7.5. Установление концентрации калибраторов в составе Положительного контроля.

- 7.5.1. Определить значение концентраций, полученных при анализе каждой из 3 повторностей калибратора в составе ПКО, с помощью программного обеспечения амплификатора.
- 7.5.2. Рассчитать концентрацию калибратора как среднее арифметическое значение трех концентраций, полученных для соответствующего калибратора в составе ПКО по формуле:

$$C = \frac{C_1 + C_2 + C_3}{3}$$

C – концентрация калибратора в составе ПКО, выраженная в УЕ/мл.

C₁ – концентрация первой повторности калибратора в составе ПКО, в УЕ/мл.

C₂ – концентрация второй повторности калибратора в составе ПКО, в УЕ/мл.

C₃ – концентрация третьей повторности калибратора в составе ПКО, в УЕ/мл.

- 7.5.3. Рассчитать концентрацию каждого калибратора аналогично пункту 7.5.2.

7.6. Проверка стабильности Положительного контроля.

- 7.6.1. Провести проверку стабильности ПКО согласно МИ-СМК-21 «Процесс проверки стабильности».
- 7.6.2. Критерием стабильности ПКО считается сохранение его характеристик в течение всего срока хранения.
- 7.6.3. При получении неудовлетворительных результатов проверки стабильности ПКО признается непригодным. Дальнейшее управление образцом осуществляется согласно МИ-СМК-08 «Управление несоответствующей продукцией».

8. Создаваемые записи

ЗФ-1 СОП-ПП-3.05 «Протокол приготовления и проверки положительных контролей для наборов SNP-SHOT».

9. Ссылки

МИ-СМК-08, ООО НПФ «Литех»	Управление несоответствующей продукцией
МИ-СМК-21, ООО НПФ «Литех»	Процесс проверки стабильности
И-ОР-01, ООО НПФ «Литех»	Инструкция по подготовке производственной одежды, персонала и посетителей к работе в производственных помещениях и по движению персонала и продукции
И-ОР-04, ООО НПФ «Литех»	Инструкция по подготовке рабочего места
И-ОР-06, ООО НПФ «Литех»	Инструкция организации работ в ПЦР-зоне ОКП

СОП-ПР-4.08, ООО НПФ «Литех»	Приготовление растворов ТЕ различной концентрации
СОП-ПР-3.07, ООО НПФ «Литех»	Приготовление контрольных образцов предприятия (КОП)
Ф-1 СОП-ПР-3.05, ООО НПФ «Литех»	Список компонентов ПКО и их концентрация
Ф-1 СОП-ОКП-2.18, ООО НПФ «Литех»	Список ПЦР-наборов, предназначенных для контроля ПКО
Ф-2 СОП-ОКП-2.18, ООО НПФ «Литех»	Критерии оценки качества ПКО
Ф-1 СОП-ОКП-4.04, ООО НПФ «Литех»	Рабочие концентрации КОП и КО, используемые для проведения выходного контроля наборов реагентов

10. Приложения.

Приложение 1	- Лист рассылки СОП-ОКП-2.18	1 лист
Приложение 2	- Лист ознакомления с СОП-ОКП-2.18	1 лист
Приложение 3	- Лист согласования СОП-ОКП-2.18	1 лист

Приложение 1

Лист рассылки СОП-ОКП-2.18

Номер копии	Должность, Ф.И.О.	Дата получения	Подпись	Сдача устаревшей версии, дата/подпись

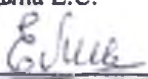
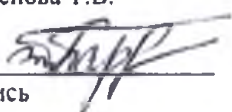
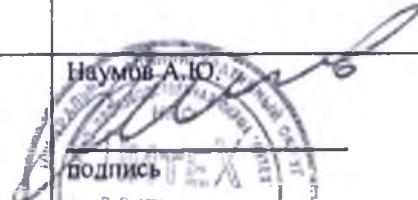
Лист ознакомления с СОП-ОКП-2.18

Приложение 2

[illegible]

Приложение 3

[illegible]

ООО НПФ «Литех»		
Вид документа: Стандартная операционная процедура		Код документа: СОП-ОКП-4.09
Наименование: Регламент проверки КОЧ		Версия №200320
Разработал Начальник отдела исследований и разработок ООО НПФ «Литех»	Согласовал Руководитель производственно- технического центра ООО НПФ «Литех»	Утвердил Директор ООО НПФ «Литех»
Лисицына Е.С.  _____	Парфенова Т.В.  _____	Наумов А.Ю.  _____
подпись	подпись	подпись
_____	_____	_____
дата	дата	дата

Стандартная операционная процедура

**«Регламент проверки контрольного образца
предприятия КОЧ»**

1. Введение

Данный регламент описывает процедуру проверки качества контрольного образца чувствительности (далее – КОЧ).

2. Применение

Регламент используется специалистом отдела контроля для проверки пригодности каждой приготовленной серии КОЧ.

3. Персонал

Специалист отдела контроля.

4. Термины, сокращения и условные обозначения

СОП	- стандартная операционная процедура
ОКП	- отдел контроля производства медицинских изделий
КОЧ	- контрольный образец чувствительности
КО	- контрольный образец
ЗФ	- заполняемая форма

5. Материалы и реагенты

Образец КОЧ, подлежащий проверке;

ТЕ-буфер, по СОП-ПР-4.08 ООО НПФ «Литех»;

Наконечники с фильтром до 100 мкл и до 1000 мкл, Omnitip;

Наконечники с фильтром до 10 мкл, Omnitip;

Пробирки полипропиленовые объемом 0,6 мл

Пробирки полипропиленовые объемом 1,5 мл

Пробирки полипропиленовые объемом 0,2 мл с оптической крышкой;

Салфетки для обработки поверхностей;

Раствор дезинфицирующий для обработки поверхностей;

Перчатки одноразовые без талька «Matrix» S,M.

6. Оборудование

Система QX100 для проведения капельной цифровой ПЦР, BioRad;

БАВ-ПЦР-"Ламинар-С", Lamsystems;

Дозаторы автоматические до 10, 40, 200 и до 1000 мкл, Ленпипет;

Миницентрифуга-вортекс Микроспин, Biosan;

Амплификатор с детекцией в режиме «реального времени» ДТ96 («ДНК-технология»).

7. Процедура

7.1. Подтверждение концентрации КОЧ

7.1.1. Провести три независимых измерения концентрации полученного образца КОЧ с помощью системы QX100 согласно инструкции к прибору.

7.1.2. Рассчитать среднее значение концентрации КОЧ по трем измерениям. Диапазон допустимых концентраций для КОЧ указан в Ф-1 СОП-ПР-3.26 «Список КОЧ и их концентрации»).

7.1.3. В случае, если концентрация КОЧ соответствует требуемому диапазону, перейти к пункту 7.2.

7.1.4. Если полученная по трем измерениям концентрация КОЧ не укладывается в требуемый диапазон, образец КОЧ признается несоответствующим, дальнейшее его тестирование не проводится. При необходимости проводятся корректирующие меры: измерение концентрации стока геномной РНК, ДНК или плазмиды и/или промежуточных растворов, из которых изготавливался КОЧ.

7.3. Валидация КОЧ

Подтверждение количественных характеристик КОЧ, проводится согласно инструкции к набору с использованием калибратора, входящего в состав набора, или аттестованного контрольного образца предприятия. Постановку реакции амплификации проводить в ПЦР-боксе, в халате и одноразовых перчатках.

7.3.1. Провести анализ КОЧ (10 повторностей) согласно инструкции к соответствующему набору реагентов.

7.3.2. Рассчитать концентрацию всех повторностей КОЧ по формуле:

$$C_{КОЧ} = C_K * 2^{(Ct_{КОЧ} - Ct_K)}$$

C_K – концентрация РНК/ДНК в калибраторе, выраженная в ГЭ/мл,

$C_{КОЧ}$ – концентрация образца КОЧ, выраженная в ГЭ/мл,

Ct_K – цикл пересечения кривой флуоресценции калибратора с пороговой линией;

$Ct_{КОЧ}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции образца КОЧ с пороговой линией;

7.3.3. Рассчитать величину отклонения измеренной концентрации КОЧ от заявленной по следующей формуле:

$$R = \frac{C_{изм}}{C_{заяв}} * 100\%$$

Процент отклонения измеренной концентрации от заявленной должен находиться в диапазоне 90-110%.

7.3.4. Рассчитать коэффициент вариации измеренной концентрации КОЧ. Для этого рассчитать среднее арифметическое значение измеренной концентрации всех повторностей КОЧ. Рассчитать коэффициент вариации по следующей формуле:

$$KB = \frac{100}{\bar{C}} \sqrt{\frac{\sum (C - \bar{C})^2}{n-1}}$$

Где n – количество повторностей измерения (n = 10),

KB должен быть не более 10%.

7.4. Анализ результатов

Образец КОЧ считается пригодным, если выполняются требования пунктов 7.1.3, 7.3.3, 7.3.4. При получении неудовлетворительных результатов процедуру проверки повторить. При повторном получении отрицательных результатов проверки КОЧ признается несоответствующим согласно МИ-СМК-08 «Управление несоответствующей продукцией».

8. Создаваемые записи

Результат проверки КОЧ регистрируется в «Протоколе приготовления КОЧ».

По результатам проверки начальником производства оформляется Паспорт на КОЧ с регистрацией полученных в п. 7.1. и 7.3. данных проверки.

9. Ссылки на регламентирующие и создаваемые документы СМК

МИ-СМК-08 «Управление несоответствующей продукцией»;

И-ОР-04 «Инструкция по подготовке рабочего места»;

ЗФ-1 СОП-ПР-3.26 "Протокол приготовления и проверки контрольного образца чувствительности";

Ф-1 СОП-ПР-3.26 «Список КОЧ и их концентрации».

10. Приложения

Приложение 1	Лист рассылки СОП-ОКП-4.09	1 лист
Приложение 2	Лист ознакомления СОП-ОКП-4.09	1 лист
Приложение 3	Лист согласования СОП-ОКП-4.09	1 лист

Приложение 1

Лист рассылки СОП-ОКП-4.09

Номер копии	Должность, Ф.И.О.	Дата получения	Подпись	Сдача устаревшей версии, дата/подпись

Копия верна
Прошито, проверено,
скреплено печатью.
Количество листов
шт.
Директор
Наумов А.Ю.



Набор реагентов для анализа однонуклеотидных полиморфизмов
в гене HFE, ассоциированных с риском развития гемохроматоза, методом ПЦР

КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ

SNP-SHOT OneStep-PB-96

Предприятие-изготовитель ООО ЦИРМИ «Литех», Москва 119435, ул. Малая Пироговская 1стр.3, тел. (495) 258-39-47

Номер серии 01/т-1008р/22 Дата изготовления 11.10.2022 Наборов в серии 380

Состав	Комплектация	Внешний вид
1.1. Амплификационная смесь HFE His63Asp	24 пробирки по 20 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости
1.2. Амплификационная смесь HFE Ser65Cys	24 пробирки по 20 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости
1.3. Амплификационная смесь HFE Cys282Tyr	24 пробирки по 20 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости
1.4. Амплификационная смесь HBB	24 пробирки по 20 мкл	Прозрачная жидкость голубого цвета под слоем вязкой прозрачной жидкости
1.5. Разбавитель	1 пробирка – 200 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость
1.6. ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11	1 пробирка – 200 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость
1.7. ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22	1 пробирка – 200 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость

Результаты контроля:

Наименование показателя	Характеристика и норма по ТУ	Результаты контроля
1. Комплектность	Согласно п.1.4. ТУ	Соответствует В комплект поставки входят: -набор реагентов; -памятка по применению набора.
2. Упаковка	Согласно п.1.6. ТУ	Соответствует
3. Маркировка	Согласно п.1.5. ТУ.	Соответствует На каждый блок компонентов, наклеена этикетка. На потребительскую упаковку каждого набора наклеена этикетка.
4. Технические характеристики		
4.1. Аналитическая чувствительность, геном-эквивалентов*/мл ДНК человека	10000	Соответствует
4.2. Аналитическая специфичность: 4.2.1. ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11	Экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала должен регистрироваться: для амплификационных смесей HFE His63Asp, HFE Ser65Cys и HFE Cys282Tyr по каналу HEX не позднее 25 цикла; по каналу FAM позднее 37 цикла или не регистрироваться совсем; для амплификационной смеси HBB по каналу HEX не позднее 25 цикла; по каналу FAM не должен регистрироваться совсем.	Соответствует
4.2.2. ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22	Экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала должен регистрироваться: для амплификационных смесей HFE His63Asp, HFE Ser65Cys и HFE Cys282Tyr по каналу FAM не позднее 25 цикла; по каналу HEX позднее 37 цикла или не регистрироваться совсем; для амплификационной смеси HBB по каналу HEX не позднее 25 цикла; по каналу FAM не должен регистрироваться совсем.	Соответствует
4.3. ОКО	Экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала не должен регистрироваться по каналам FAM, HEX для всех смесей.	Соответствует

ПРИМЕЧАНИЕ.

* геном-эквивалент (гэ) – суммарное количество генетического материала в одной клетке.

Условия хранения:

Набор реагентов КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ варианта исполнения *SNP-SHOT OneStep-PB-96* должен храниться при температуре 18...-20°C в течение всего срока годности.

Условия транспортировки:

Набор реагентов КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ варианта исполнения *SNP-SHOT OneStep-PB-96* рекомендуется транспортировать при температуре его хранения. Допустима транспортировка при температуре +2...+8 °C в течение 1 суток (не более), либо в пенопластовых контейнерах с сухим льдом в течение 3 суток.

Заключение отдела контроля производства медицинских изделий:

ГОДЕН ДО 11.04.2023

Набор реагентов КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ *SNP-SHOT OneStep-PB-96* серии 01/t-1008p/22 соответствует требованиям ТУ 21.20.23-1008-17253567- 2022.

Начальник отдела контроля производства медицинских изделий _____

Чижикова А.И.

Дата выдачи паспорта: 11.10.2022



Набор реагентов для анализа однонуклеотидных полиморфизмов
в гене HFE, ассоциированных с риском развития гемохроматоза, методом ПЦР
КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ

SNP-SHOT TwoStep-PB-96

Предприятие-изготовитель ООО ИПФ «Литех», Москва 119435, ул. Малая Пироговская 1 стр.3, тел. (495) 258-39-47

Номер серии 01/1-1008TS/22 Дата изготовления 11.10.2022 Наборов в серии 380

Состав	Комплектация	Внешний вид
1.1. Реакционная смесь HFE His63Asp	24 пробирки по 15 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета
1.2. Реакционная смесь HFE Ser65Cys	24 пробирки по 15 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета
1.3. Реакционная смесь HFE Cys282Tyr	24 пробирки по 15 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета
1.4. Реакционная смесь HBB	24 пробирки по 15 мкл	Прозрачная жидкость голубого цвета под пробкой белого цвета
1.5. Раствор Таq-полимеразы	1 пробирка – 550 мкл	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость
1.6. Разбавитель	1 пробирка – 200 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость
1.7. ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11	1 пробирка – 200 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость
1.8. ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22	1 пробирка – 200 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость

Результаты контроля:

Наименование показателя	Характеристика и норма по ТУ	Результаты контроля
1. Комплектность	Согласно п.1.4. ТУ	Соответствует В комплект поставки входят: -набор реагентов; -памятка по применению набора.
2. Упаковка	Согласно п.1.6. ТУ	Соответствует
3. Маркировка	Согласно п.1.5. ТУ.	Соответствует На каждый блок компонентов, наклеена этикетка. На потребительскую упаковку каждого набора наклеена этикетка.
4. Технические характеристики		
4.1. Аналитическая чувствительность, геном-эквивалентов*/мл ДНК человека	10000	Соответствует
4.2. Аналитическая специфичность: 4.2.1. ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11	Экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала должен регистрироваться: для реакционных смесей HFE His63Asp, HFE Ser65Cys и HFE Cys282Tyr по каналу HEX не позднее 25 цикла; по каналу FAM позднее 37 цикла или не регистрироваться совсем; для реакционной смеси HBB по каналу HEX не позднее 25 цикла; по каналу FAM не должен регистрироваться совсем.	Соответствует
4.2.2. ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22	Экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала должен регистрироваться: для реакционных смесей HFE His63Asp, HFE Ser65Cys и HFE Cys282Tyr по каналу FAM не позднее 25 цикла; по каналу HEX позднее 37 цикла или не регистрироваться совсем; для реакционной смеси HBB по каналу HEX не позднее 25 цикла; по каналу FAM не должен регистрироваться совсем.	Соответствует
4.3. ОКО	Экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала не должен регистрироваться по каналам FAM, HEX для всех смесей.	Соответствует

ПРИМЕЧАНИЕ.

* геном-эквивалент (ГЭ) – суммарное количество генетического материала в одной клетке.

Условия хранения:

Набор реагентов КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ варианта исполнения *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* должен храниться при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности.

Условия транспортировки:

Набор реагентов КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ варианта исполнения *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* рекомендуется транспортировать при температуре его хранения. Допустима транспортировка при температуре +18...+25 °C в течение 3 суток (не более).

Заключение отдела контроля производства медицинских изделий:

ГОДЕН ДО 11.07.2023

Набор реагентов КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* серии 01/t-1008TS/22 соответствует требованиям ТУ 21.20.23-1008-17253567- 2022.

Начальник отдела контроля производства медицинских изделий _____

Чижикова А.И.

Дата выдачи паспорта: 11.10.2022



Копия верна
Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов

шт.

Директор

Наумов А.Ю.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики in vitro
 «Набор реагентов для анализа однонуклеотидных полиморфизмов в гене HFE,
 ассоциированных с риском развития гемохроматоза, методом ПЦР

КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** предназначен для одновременного качественного выявления полиморфизмов в гене HFE генома человека, ассоциированных с риском развития гемохроматоза, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробах ДНК человека, выделенных из клинических образцов (цельная кровь и Buccal swab).

Функциональное назначение – Набор реагентов **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** предназначен для диагностики наследственного гемохроматоза, обусловленного полиморфизмами His63Asp, Cys282Tyr и Ser65Cys в гене HFE.

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.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА – клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению. Набор реагентов **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** может быть использован в клинической лабораторной диагностике генетической предрасположенности к гемохроматозу.

3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА - сотрудники клиничко-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ДНК-диагностики.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** выпускается в 2 вариантах исполнения.

Варианты исполнения набора различаются степенью готовности реагентов к проведению анализа (OneStep-PB-96, TwoStep-PB-96) (табл. 1).

Набор рассчитан на проведение анализа 24 образцов на 3 полиморфизма и один контроль взятия материала, и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах.

Таблица 1

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
1	SNP-SHOT OneStep-PB-96	1. Амплификационные смеси:	
		HFE His63Asp	24 пробирки по 20 мкл
		HFE Ser65Cys	24 пробирки по 20 мкл
		HFE Cys282Tyr	24 пробирки по 20 мкл
		HBB	24 пробирки по 20 мкл
		2. Разбавитель	1 пробирка – 200 мкл
		3. ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11	1 пробирка – 200 мкл
		4. ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22	1 пробирка – 200 мкл

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
2	<i>SNP-SHOT TwoStep-PB-96</i>	1. Реакционные смеси:	
		HFE His63Asp	24 пробирки по 15 мкл
		HFE Ser65Cys	24 пробирки по 15 мкл
		HFE Cys282Tyr	24 пробирки по 15 мкл
		HBB	24 пробирки по 15 мкл
		2. Раствор Taq-полимеразы	1 пробирка - 550 мкл
		3. Разбавитель	1 пробирка – 200 мкл
		4. ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11	1 пробирка – 200 мкл
		5. ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22	1 пробирка – 200 мкл

В состав комплектаций набора входят готовые к применению реагенты.

В состав каждой амплификационной (реакционной) смеси на полиморфизмы в гене HFE входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфичных праймеров, необходимых для амплификации участка, содержащего полиморфизм;
- ПЦР-буфер;
- аллель-специфичные гидролизные зонды, содержащие полиморфные сайты: зонд, содержащий полиморфизм аллель 1, мечен флуорофором HEX; зонд, содержащий полиморфизм аллель 2 мечен флуорофором FAM.

В состав амплификационной (реакционной) смеси HBB входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфичных праймеров, необходимых для амплификации участка гена b-глобина человека (HBB);
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентный зонд (1 зонд): зонд для участка гена HBB, содержит флуорофор HEX.

Амплификационная (реакционная) смесь HBB предназначена для контроля взятия материала, позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации: выявлять наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию, а также исключать из анализа пробы с недостаточным содержанием ДНК человека.

Амплификационная смесь комплектации *SNP-SHOT OneStep-PB-96* полностью готова к амплификации, содержит Taq-полимеразу;

Реакционная смесь комплектации *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* требует внесения Taq-полимеразы, входящей в состав набора.

ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11 представляет собой смесь ДНК-мишеней, соответствующих аллелям 1 полиморфизмов His63Asp, Cys282Tyr и Ser65Cys в гене HFE, и фрагмента участка b-глобина человека (HBB).

ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22 представляет собой смесь ДНК-мишеней, соответствующих аллелям 2 полиморфизмов His63Asp, Cys282Tyr и Ser65Cys в гене HFE, и фрагмента участка b-глобина человека (HBB).

4.2. Комплектность

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- памятка по применению набора.

Паспорт предоставляется по запросу пользователя.

Полная инструкция по применению представлена на сайте производителя www.lytech.ru (ГОСТ 51088). На бумажном носителе инструкция предоставляется по запросу пользователя.

4.3. Принцип метода

Набор реагентов **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения полиморфизмов в генах ДНК человека путем накопления (амплификации) фрагментов ДНК, ограниченных специфически подобранными праймерами.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

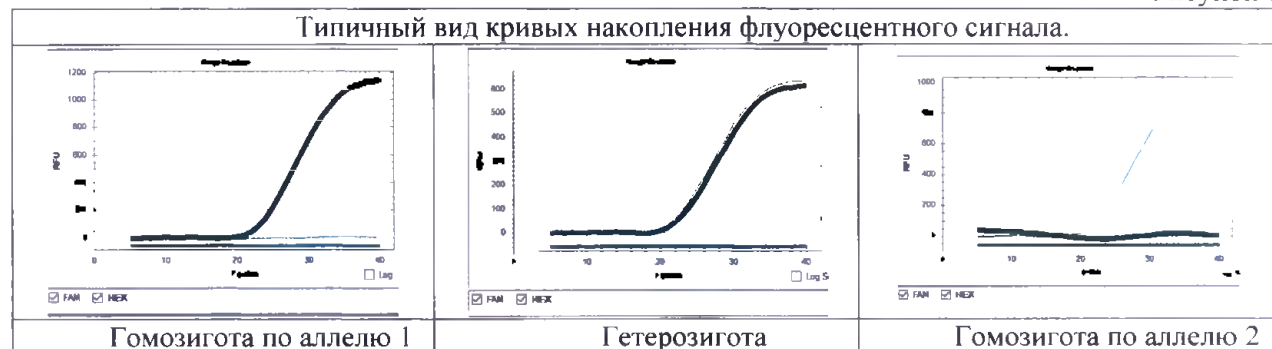
Гибридизационно-флуоресцентная детекция позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени»). Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе.

Амплификационная/реакционная смесь содержит два аллель-специфичных зонда, меченных различными флуорофорами. В процессе амплификации зонды конкурируют за связывание с матрицей в участке с определяемым полиморфизмом. Преимущество получает тот зонд, который соответствует представленному в образце аллелю. Если в исследуемом образце присутствует два одинаковых аллеля, то с ДНК-мишенью связывается только один из сигнальных зондов, и данный образец интерпретируется как гомозигота по определенному аллелю. В случае присутствия в образце двух разных аллелей, оба зонда будут гибридизоваться с одинаковой вероятностью, и образец будет интерпретироваться как гетерозигота.

В ходе последующей элонгации происходит разрушение полностью комплементарного матрице зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе. Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов, что даёт возможность визуализировать результат и осуществлять дискриминацию аллелей.

Результаты анализа позволяют дать три типа заключений: гомозигота по аллелю 1, гетерозигота, гомозигота по аллелю 2 для каждого определяемого полиморфизма. В случае гомозиготы по аллелю 1 кривая накопления флуоресцентного сигнала будет представлена только по каналу Флуорофора 1; в случае гомозиготы по аллелю 2 - по каналу Флуорофора 2; в случае гетерозиготы будут представлены равнозначные кривые накопления по каналам обоих Флуорофоров (Рисунок 1).

Рисунок 1



Примечание: кривая накопления флуоресцентного сигнала по каналу Флуорофора 1 обозначена жирной линией; по каналу Флуорофора 2 - тонкой линией.

4.4. Коммутабельность контрольных образцов предприятия подтверждена результатами измерения концентрации и генотипирования ДНК референтной и рутинной методиками, предназначенными для измерения показателей концентрации или аллель-специфичного анализа генетической последовательности, соответственно, при исследовании ДНК, выделенной из соответствующих клинических образцов.

4.5. Ограничения метода

При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с ДНК, могут наблюдаться ложноотрицательные реакции, а также занижение реального содержания исследуемой ДНК в клиническом образце.

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

5.1. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность составляет 10^4 геном-эквивалентов/мл ДНК человека в прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе.

5.2. Аналитическая специфичность

Специфичность анализа 100%. Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами) и зондами, подобранными к определенным аллелям генов человека и условиями реакции амплификации.

В образцах биологического материала человека после завершения реакции амплификации должен определяться генотип исследуемого образца.

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА¹

6.1. Диагностическая чувствительность выявления полиморфизма His63Asp в гене HFE: 100 % (интервал 98,3-100%, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления полиморфизма Ser65Cys в гене HFE: 100 % (интервал 87,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления полиморфизма Cys282Tyr в гене HFE: 100 % (интервал 93,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.2. Диагностическая специфичность выявления полиморфизма His63Asp в гене HFE: 100 % (интервал 99,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления полиморфизма Ser65Cys в гене HFE: 100 % (интервал 99,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления полиморфизма Cys282Tyr в гене HFE: 100 % (интервал 99,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.3. Показана тождественность диагностических характеристик набора **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** (таблица 2) на разных видах клинических образцов (цельная кровь и буккальный соскоб).

Таблица 2

Клинический материал	Количество образцов от пациентов	Полиморфизм	Генотип	Результаты испытаний	
				Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Цельная кровь	607	His63Asp в гене HFE	Гомозигота по Аллелю1	100% (95% ДИ: 99,3-100%)	100%, (95% ДИ: 98,3-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 98,1-100%)	100% (95% ДИ: 99,3-100%)
			Гомозигота по Аллелю2	100% (95% ДИ: 93,8-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
		Ser65Cys в гене HFE	Гомозигота по Аллелю1	100% (95% ДИ: 99,5-100%)	100% (95% ДИ: 87,8-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 85,4-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
			Гомозигота по Аллелю2*	100% (95% ДИ: 47,3-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
		Cys282Tyr в гене HFE	Гомозигота по Аллелю1	100% (95% ДИ: 99,5-100%)	100% (95% ДИ: 93,1-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 92,6-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
			Гомозигота по Аллелю2*	100% (95% ДИ: 36,8-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
Буккальный соскоб	622	His63Asp в гене HFE	Гомозигота по Аллелю1	100% (95% ДИ: 99,3-100%)	100% (95% ДИ: 98,3-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 98,2-100%)	100% (95% ДИ: 99,3-100%)
			Гомозигота по Аллелю2	100% (95% ДИ: 76,2-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
		Ser65Cys в гене HFE	Гомозигота по Аллелю1	100% (95% ДИ: 99,5-100%)	100% (95% ДИ: 88,7-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 86,1-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)

¹ диагностические характеристики представлены для гетерозиготных и гомозиготных носителей полиморфизма.

		Cys282Tyr в гене HFE	Гомозигота по Аллелю2*	100% (95% ДИ: 54,9-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
			Гомозигота по Аллелю1	100% (95% ДИ: 99,5-100%)	100% (95% ДИ: 93,3-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 93,0-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
			Гомозигота по Аллелю2*	100% (95% ДИ: 22,4-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)

* Представленная выборка образцов недостаточна для подтверждения высокой диагностической чувствительности исследуемого набора реагентов, однако, ввиду редкой встречаемости образцов цельной крови и буккального соскоба от пациентов с генотипами Гомозигота по Аллелю 2 по полиморфизму Ser65Cys в гене HFE и Гомозигота по Аллелю 2 по полиморфизму Cys282Tyr в гене HFE, исследование более широкой выборки на данном этапе не представляется возможным.

6.4. Воспроизводимость результатов исследования с использованием набора **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** составляет 100% и подтверждена в ходе проведения клинических испытаний на разных сериях набора (внутрисерийная, межсерийная и внутрипостановочная воспроизводимость). Коэффициент вариации измерения Ct по соответствующим каналам флуоресценции для одного и того же образца не превышает 4%.

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 санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» 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 СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

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 специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.
- Не использовать набор по истечении срока годности.

7.2. Требования охраны окружающей среды

7.2.1. 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.

7.2.2. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды,

7.2.3. 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.

7.2.4. 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.

7.2.5. 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. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для всех вариантов исполнения набора

- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени;
- микроцентрифуга-вортекс 1,5-3 тыс.об/мин;
- пипетка-дозатор переменного объема 5 - 50 мкл для работы с биопробами;
- одноразовые наконечники до 10, 50, 200 и 1000 мкл для приготовления рабочей смеси реагентов ;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;
- штатив для пробирок 0,5 мл (или 0,2 мл) «рабочее место»;
- штативы для наконечников 200 мкл;
- одноразовые перчатки;
- емкость для сброса использованных наконечников;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- набор реагентов для проведения ПЦР.

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

9.1. Материал для исследования.

Материалом для исследования набором реагентов **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** являются образцы ДНК человека, выделенные из клинических проб (цельная кровь, буккальный соскоб).

9.2. Взятие, доставка и хранение клинических образцов

Особенности забора и хранения цельной крови.

2000 мкл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку с 200 мкл раствора антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия). Гепарин использовать не рекомендуется.

Внимание! При использовании для забора крови вакуумных пробирок с ЭДТА или цитратом натрия дополнительное внесение антикоагулянта не требуется. При этом объем крови, необходимый для исследования, заранее маркируется на пробирке в соответствии с количеством антикоагулянта, помещенного в пробирку.

Неохлажденные пробы использовать в течение 2-х часов для выделения ДНК; хранить при +4...+8°C - не более 1 суток; не замораживать!

Особенности взятия буккального соскоба.

Перед забором буккального соскоба рекомендуется не есть в течение 30 мин. В полости рта не должно быть остатков пищи. У младенцев на грудном вскармливании рекомендуется брать образцы не ранее чем 1-2 часа после последнего кормления. Желательно в течение суток воздержаться от применения местных препаратов и процедур, приема алкоголя, обследоваться до или не ранее 14 суток после окончания курса антибактериальной, антигрибковой терапии, если иное не рекомендовано врачом.

Соскоб берут сухим стерильным одноразовым зондом вращательными движениями с небольшим надавливанием, покрутив с внутренней поверхности одной и второй щеки в течение 6 секунд. Сразу после получения образца рабочую часть зонда с щеточкой помещают в стерильную одноразовую

пробирку со специальной транспортной средой для ПЦР-исследований, и аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см (в области специальной насечки) от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывают крышкой и маркируют. Важно помнить, что является неприемлемым использование многоразовых ножниц для обрезки рабочей части зонда — это может привести к перекрестной контаминации клиническим материалом и, как следствие, получения недостоверных результатов.

Материал транспортируется в пробирке типа «Эппендорф» с транспортной средой, хранить при + 2 + 8 С, доставка в термоконтейнерах с охлаждающими элементами.

9.3. Предварительная обработка клинического материала

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

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, буккальный соскоб**) для ПЦР-диагностики и позволяющие максимально удалить ингибиторы ПЦР из образца. Производитель рекомендует использовать зарегистрированный в установленном порядке набор «НК-сорбент» (ООО НПФ «Литех», РЗН 2019/9331) совместно с набором **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** для полного цикла исследования образцов.

9.4. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой

Материалом для исследования набором реагентов **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** являются образцы ДНК человека, выделенные из клинических проб.

Анализ рисков показал, что возможными ошибками применения набора реагентов **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** могут являться:

- использование непредусмотренных для данного изделия видов анализируемого биологического материала или наборов для пробоподготовки (выделение ДНК);
- эндогенные интерферирующие вещества, входящие в состав клинического материала (например, метаболиты, образующиеся при патологических состояниях, таких как сахарный диабет; множественная миелома; холестатический гепатит; гемолиз, т.е. разрушение эритроцитов с выходом в жидкую часть крови ряда внутриклеточных компонентов), приводящие к получению недостаточно очищенного препарата ДНК в результате неэффективной экстракции наборами для пробоподготовки; такие образцы должны быть отбракованы на преаналитическом этапе анализа и не подвергаться дальнейшему исследованию;
- экзогенные интерферирующие вещества (например, лекарственные средства и их метаболиты, парентеральное питание, плазма расщирители, антикоагулянты; вещества, принимаемые пациентом, такие как алкоголь, наркотики, пищевые добавки и т.п.; вещества, добавленные во время приготовления образца, такие как антикоагулянты, консерванты, стабилизаторы).

Все это может приводить к ингибированию реакции амплификации, снижению чувствительности анализа и получению недостоверных результатов.

При использовании зарегистрированного в установленном порядке набора реагентов для выделения НК «НК-сорбент» (РУ № РЗН 2019/9331) интерференции не ожидается.

Производителем Набора реагентов НК-сорбент было показано сохранение эффективности выделения НК из цельной крови и буккального соскоба в случае присутствия в клинических образцах потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, соответствующих верхней границе физиологической нормы, и превышающих их в несколько раз (Таблица 3).

Таблица 3

Клинический образец	Интерферент	Допустимое содержание в образце
цельная кровь	жиры	50%
	К2-ЭДТА	1,8 мг/мл
	цитратнатрия	0,129 моль/л
буккальный соскоб	кровь	10%

Контроль качества тестируемой ДНК (недостаточное количество, присутствие возможных ингибиторов) осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения детектирующего амплификатора. Образец ненадлежащего качества будет интерпретироваться как невалидный.

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Все компоненты необходимо добавлять отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами (фильтрами). Такие же наконечники необходимо использовать и для внесения в пробирки препарата ДНК.

После внесения образца, пробирки с реакционными смесями должны быть как можно скорее помещены в амплификатор.

10.1. Подготовка к проведению амплификации, вариант исполнения *SNP-SHOT OneStep-PB-96*.

10.1.1. Приготовить и расставить в указанном в протоколе измерений порядке необходимое количество стрипов с раскапанными амплификационными смесями, включая стрипы для положительных контрольных образцов (ПКО) и отрицательного контрольного образца. Маркировка пробирок не допускается!

Для исследования одного образца ДНК требуется половина одного стрипа (по четыре пробирки А-Д, либо Е-Н). В каждой пробирке представлена амплификационная смесь для определения соответствующего полиморфизма в гене HFE или контроля взятия материала (HBB).

Расположение амплификационных смесей представлено на Рис. 2.

Рисунок 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HFE His63Asp											
B	HFE Ser65Cys											
C	HFE Cys282Tyr											
D	HBB											
E	HFE His63Asp											
F	HFE Ser65Cys											
G	HFE Cys282Tyr											
H	HBB											

10.1.2. Полностью разморозить компоненты из набора. Растворы разбавителя и ПКО тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

10.1.3. В 4 пробирки стрипа с различными амплификационными смесями добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 5 мкл:

- а) в 4 пробирки стрипа для отрицательного контрольного образца (ОКО) – разбавитель;
- б) в 4 пробирки стрипа для исследуемого образца – исследуемый образец ДНК;
- в) в 4 пробирки стрипов для положительных контрольных образцов – ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11 и ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22, соответственно.

10.1.4. Стрипованные пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при комнатной температуре на предназначенной для этого центрифуге.

Перейти к п.10.3.

10.2. Подготовка к проведению амплификации, вариант исполнения *SNP-SHOT TwoStep-PB-96*.

10.2.1. Приготовить и расставить в указанном в протоколе измерений порядке необходимое количество стрипов с раскапанными реакционными смесями, включая стрипы для положительных контрольных образцов (ПКО) и отрицательного контрольного образца. Маркировка пробирок не допускается!

Для исследования одного образца ДНК требуется половина одного стрипа (по четыре пробирки А-Д, либо Е-Н). В каждой пробирке представлена реакционная смесь для определения соответствующего полиморфизма в гене HFE или контроля взятия материала (HBB).

Расположение реакционных смесей представлено на Рис. 3.

Рисунок 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HFE His63 Asp											
B	HFE Ser65Cys											
C	HFE Cys282Tyr											
D	HBB											
E	HFE His63 Asp											
F	HFE Ser65Cys											
G	HFE Cys282Tyr											
H	HBB											

10.2.2. Пробирку с раствором Таq-полимеразы перемешать пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

10.2.3. Внести в расставленные пробирки по 5 мкл раствора Таq-полимеразы для приготовления амплификационных смесей.

10.2.4. Растворы разбавителя и ПКО тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

10.2.5. В 4 пробирки стрипа с различными амплификационными смесями добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 5 мкл:

а) в 4 пробирки стрипа для отрицательного контрольного образца (ОКО) – разбавитель;

б) в 4 пробирки стрипа для исследуемого образца – исследуемый образец ДНК;

в) в 4 пробирки стрипов для положительных контрольных образцов – ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11 и ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22, соответственно.

10.2.6. Стрипованные пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при комнатной температуре на предназначенной для этого центрифуге. Перейти к п.10.3.

10.3. Проведение амплификации, все варианты исполнения.

10.3.1. Перенести пробирки в амплификатор с детекцией результатов «в режиме реального времени» и провести амплификацию по следующим программам (ниже представлена Таблица 4 с программами амплификации для комплектаций *SNP-SHOT OneStep-PB-96* и *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* для различных видов амплификаторов):

«CFX96» (BioRad)

+80 °C	2 мин*	
+94°C	3 мин	
+94°C	15 сек	40 циклов
+64°C	40 сек (считывание по каналам FAM, HEX)	

«ДТ96» (ДНК-Технология)

+80 °C	2 мин*	
+94 °C	3мин	
+94 °C	15сек	5 циклов
+64°C	40 сек	
+94 °C	15 сек	35 циклов
+64°C	40 сек (считывание по каналам FAM, HEX)	

«LightCycler96» (Roche)

+80 °C	120 сек*	40 циклов
+94 °C	180 сек	
+94°C	10 сек	
+62 °C	40 сек (считывание по каналам FAM, HEX) (ramp rate 2,2°C/сек)	

* - для комплектаций OneStep раздел программы +80 °C - 2 мин необязателен.

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора (www.lytech.ru).

11. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Детекция результатов

При проведении ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» измерения осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ**, представлены на примере амплификатора с детекцией в режиме «реального времени» «CFX96» (BioRad).

Во вкладке **Settings** выставить следующие настройки (Таблица 4):

Таблица 4

Канал	Cycles to Analyze...	BaselineSetting
HEX	5 - 40	Apply Flourescence Drift Correction
FAM		

На вкладке Allelic discrimination в поле Selected Fluorophores назначить для Аллеля 1 канал HEX, для Аллеля 2 – канал FAM.

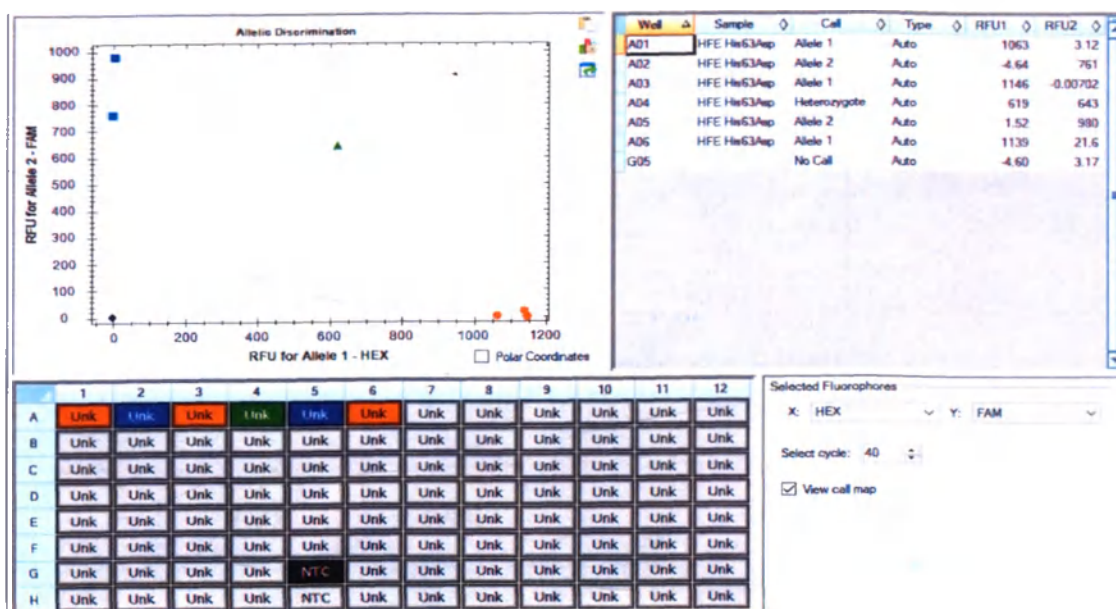
Программа автоматически интерпретирует результаты.

При наличии в постановке Контрольных образцов необходимо убедиться, что тип образца установлен правильно.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

Пример представления результата анализа генотипирования по полиморфизму His63Asp гена HFE программным обеспечением CFX96 представлен на рисунке 4.

В левом верхнем окне – График ОЕФ (отображение данных на графике относительных единиц флуоресценции – RFU), где генотипы разделяются на зоны. Нижнее окно отображает данные в виде цветовой карты, где каждый генотип обозначается соответствующим цветом. В верхнем правом окне – «Электронная таблица данных лунок», перечисляющая данные дискриминации аллелей, собранные в каждой лунке.



11.2. Интерпретация результатов

В наборе предусмотрен контроль взятия материала с помощью амплификационной смеси НВВ, предназначенный для исключения из анализа невалидных образцов (с недостаточным содержанием ДНК для анализа, содержащих ингибиторы ПЦР).

Определение генотипа образца проводится только в случае получения правильных значений C_t для образца для амплификационной смеси НВВ (указаны в таблице 5).

Таблица 5

Образец	Значения C_t (НВВ)	
	Канал FAM	Канал HEX
ПКО	НЗ	< 25
ОКО	НЗ	НЗ
Исследуемый образец	НЗ	< 35

Примечание: НЗ – нет значения (значение N/A или НД), КЦ – конечный цикл.

В случае получения невалидных значений C_t для амплификационной смеси НВВ, образец считается непригодным для генотипирования. Требуется повтор анализа образца с этапа пробоподготовки.

При использовании амплификатора CFX96 интерпретация результатов проводится во вкладке *Allelic Discrimination*.

Аллельный дискриминантный анализ требует следующего минимального содержания лунок:

- наличие двух флуорофоров в каждой лунке;
- наличие не менее одного образца без ДНК-мишени (ОКО) с обозначением *NTC* для оптимизации анализа данных.

Необходимо убедиться, что результаты генотипирования ПКО соответствуют заявленным генотипам: ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 11 – Allele 1; ПКО «ГЕМОХРОМАТОЗ» 22 – Allele 2.

Генотипирование образцов происходит автоматически с отображением заключения по каждому полиморфизму: гомозигота по аллелю 1, гетерозигота или гомозигота по аллелю 2.

Образцы, не прошедшие ПЦР с интерпретацией *NoCall*, могут содержать мутации в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с ДНК.

Аллельные варианты, детектируемые по использованным каналам флуоресценции, представлены в таблице 6.

Таблица 6

Амплификационная/реакционная смесь	Канал флуоресценции и детектируемая мишень	
	HEX Аллель 1	FAM Аллель 2
HFE His63Asp	(His)C	(Asp)G
HFE Ser65Cys	(Ser)A	(Cys)T
HFE Cys282Tyr	(Cys)G	(Tyr)A

Интерпретация результатов анализа с целью выявления и идентификации аллелей гена HFE проводится в соответствии с таблицей 7.

Таблица 7

	HEX	FAM	Заключение
ОКО	No Call	No Call	Отсутствие амплификации
ПКО 11	Allele 1	-	Гомозигота по аллелю 1
ПКО 22	-	Allele 2	Гомозигота по аллелю 2
Исследуемый образец	Allele 1	-	Гомозигота по аллелю 1
	Heterozygote	Heterozygote	Гетерозигота
	-	Allele 2	Гомозигота по аллелю 2
	Undetermined	Undetermined	Неопределённый. Образец ненадлежащего качества. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа с этапа пробоподготовки

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Условия хранения

Набор **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** варианта исполнения *SNP-SHOT OneStep-PB-96* должен храниться при температуре -18...-20 °C в течение всего срока годности. Срок годности набора – 6 месяцев.

Набор **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** варианта исполнения *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* должен храниться при температуре +2...+8 °C в течение всего срока годности. Срок годности набора – 9 месяцев.

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 **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в отапливаемых герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств. Условия транспортирования набора должны соответствовать условиям хранения!

Для наборов реагентов **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** варианта исполнения *SNP-SHOT OneStep-PB-96* допустима транспортировка при температуре +2...+8 °C в течение 1 суток (не более), либо в пенопластовых контейнерах с сухим льдом в течение 3 суток.

Для наборов реагентов **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ** варианта исполнения *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* допустима транспортировка при температуре +18...+25 °C в течение 3 дней (не более).

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

13. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НАБОРА

Предприятие-изготовитель проводит приемочные испытания для каждой производственной серии, осуществляя верификационный контроль основных аналитических характеристик (технические характеристики), внешний вид, комплектность, упаковку, маркировку, а также контроль качества сырья и компонентов.

14. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 1.2.3684-21.

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

Отходы биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные отходы) из клиничко-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, образцы материала после пробоподготовки (выделение ДНК) и отходы после проведения амплификации относятся к классу Б (эпидемически опасные отходы).

Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

15. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора **КОМПЛЕКС ГЕМОХРОМАТОЗ**, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 13 ЛИСТОВ

« 07 » 12 2022 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов
шт.

Директор
Наумов А.Ю.

