



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НПФ «Литех»

А.Ю.Наумов

2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики in vitro

«Набор реагентов для анализа однонуклеотидных полиморфизмов в генах F2, F5, F7, F13A1, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, ассоциированных с риском развития тромбофилии, методом ПЦР

КОМПЛЕКС ТРОМБОФИЛИЯ»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **КОМПЛЕКС ТРОМБОФИЛИЯ** предназначен для одновременного качественного выявления полиморфизмов в генах F2, F5, F7, F13A1, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1 генома человека, ассоциированных с риском развития тромбофилии, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в пробах ДНК человека, выделенных из клинических образцов (цельная кровь и буккальный соскоб).

Функциональное назначение – Набор реагентов **КОМПЛЕКС ТРОМБОФИЛИЯ** предназначен для диагностики наследственной тромбофилии, обусловленной полиморфизмами G20210A в гене F2, Arg506Gln в гене F5, Arg353Gln в гене F7, Val35Leu в гене F13A1, G-455A в гене FGB, C807T в гене ITGA2, Leu33Pro в гене ITGB3, -675 5G/4G в гене PAI-1.

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 ТРОМБОФИЛИЯ** может быть использован в клинической лабораторной диагностике генетической предрасположенности к тромбофилии.

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 ТРОМБОФИЛИЯ** 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 12 образцов на 8 полиморфизмов, включая контрольные образцы, 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	<i>SNP-SHOT OneStep-PB-96</i>	1. Амплификационные смеси:	
		F2 G20210A	12 пробирок по 20 мкл
		F5 Arg506Gln	12 пробирок по 20 мкл
		F7 Arg353Gln	12 пробирок по 20 мкл
		F13A1 Val35Leu	12 пробирок по 20 мкл
		FGB G-455A	12 пробирок по 20 мкл
		ITGA2 C807T	12 пробирок по 20 мкл
		ITGB3 Leu33Pro	12 пробирок по 20 мкл
		PAI-1 -675 5G/4G	12 пробирок по 20 мкл
		2. Разбавитель	1 пробирка – 200 мкл
		3. ПКО «Тромбофилия» 11	1 пробирка – 200 мкл
		4. ПКО «Тромбофилия» 22	1 пробирка – 200 мкл
2	<i>SNP-SHOT TwoStep-PB-96</i>	1. Реакционные смеси:	
		F2 G20210A	12 пробирок по 15 мкл
		F5 Arg506Gln	12 пробирок по 15 мкл
		F7 Arg353Gln	12 пробирок по 15 мкл
		F13A1 Val35Leu	12 пробирок по 15 мкл
		FGB G-455A	12 пробирок по 15 мкл
		ITGA2 C807T	12 пробирок по 15 мкл
		ITGB3 Leu33Pro	12 пробирок по 15 мкл
		PAI-1 -675 5G/4G	12 пробирок по 15 мкл
		2. Раствор Taq-полимеразы	1 пробирка - 550 мкл
		3. Разбавитель	1 пробирка – 200 мкл
		4. ПКО «Тромбофилия» 11	1 пробирка – 200 мкл
		5. ПКО «Тромбофилия» 22	1 пробирка – 200 мкл

В состав комплектаций набора входят готовые к применению реагенты.

В состав каждой амплификационной (реакционной) смеси 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.

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 «Тромбофилия» 11 представляет собой смесь ДНК-мишеней, соответствующих аллелям 1 полиморфизмов в генах F2, F5, F7, F13A1, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1.

ПКО «Тромбофилия» 22 представляет собой смесь ДНК-мишеней, соответствующих аллелям 2 полиморфизмов в генах F2, F5, F7, F13A1, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1.

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 ТРОМБОФИЛИЯ** 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.

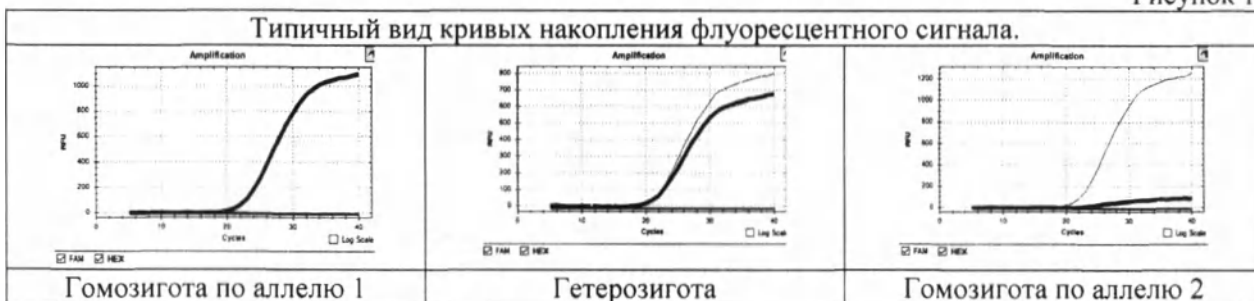
Гибридизационно-флуоресцентная детекция позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени»). Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе.

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 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.

5.2. Аналитическая чувствительность

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

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА¹

6.1. Диагностическая чувствительность выявления полиморфизма G20210A в гене F2²: 100 % (интервал 76,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления полиморфизма Arg506Gln в гене F5²: 100 % (интервал 36,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления полиморфизма Arg353Gln в гене F7: 100 % (интервал 95,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления полиморфизма Val35Leu в гене F13A1: 100 % (интервал 93,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления полиморфизма G-455A в гене FGB: 100 % (интервал 96,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления полиморфизма C807T в гене ITGA2: 100 % (интервал 97,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления полиморфизма Leu33Pro в гене ITGB3: 100 % (интервал 98,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления полиморфизма -675 5G/4G в гене PAI-1: 100 % (интервал 98,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.2. Диагностическая специфичность выявления полиморфизма G20210A в гене F2: 100 % (интервал 99,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления полиморфизма Arg506Gln в гене F5: 100 % (интервал 99,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления полиморфизма Arg353Gln в гене F7: 100 % (интервал 99,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления полиморфизма Val35Leu в гене F13A1: 100 % (интервал 99,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления полиморфизма G-455A в гене FGB: 100 % (интервал 99,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления полиморфизма C807T в гене ITGA2: 100 % (интервал 99,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления полиморфизма Leu33Pro в гене ITGB3: 100 % (интервал 99,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления полиморфизма -675 5G/4G в гене PAI-1: 100 % (интервал 99,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

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

¹ диагностические характеристики представлены для гетерозиготных и гомозиготных носителей полиморфизма.

² представленная выборка образцов недостаточна для подтверждения высокой диагностической чувствительности исследуемого набора реагентов, однако, ввиду редкой встречаемости полиморфизмов исследование более широкой выборки на данном этапе не представляется возможным.

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

Таблица 2.

Клинический материал	Количество образцов от пациентов	Полиморфизм	Генотип	Результаты испытаний	
				Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Цельная кровь	997	G20210A в гене F2	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,7-100%)	100% (95% ДИ: 91,4-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 85,4-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
			Гомозигота по Аллелю 2*	100% (95% ДИ: 76,2-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
		Arg506Gln в гене F5	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,7-100%)	100% (95% ДИ: 81,9-100%)
			Гетерозигота*	100% (95% ДИ: 71,7-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
			Гомозигота по Аллелю 2*	100% (95% ДИ: 60,7-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
		Arg353Gln в гене F7	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,5-100%)	100% (95% ДИ: 99,3-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 99,0-100%)	100% (95% ДИ: 99,6-100%)
			Гомозигота по Аллелю 2	100% (95% ДИ: 96,6-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
		Val35Leu в гене F13A1	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,4-100%)	100% (95% ДИ: 99,4-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 99,3-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
			Гомозигота по Аллелю 2	100% (95% ДИ: 94,5-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
		G-455A в гене FGB	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,4-100%)	100% (95% ДИ: 99,4-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 99,2-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
			Гомозигота по Аллелю 2	100% (95% ДИ: 97,7-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
		C807T в гене ITGA2	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,4-100%)	100% (95% ДИ: 99,4-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 99,2-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
			Гомозигота по Аллелю 2	100% (95% ДИ: 97,5-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
		Leu33Pro в гене ITGB3	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,0-100%)	100% (95% ДИ: 99,6-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 99,3-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
			Гомозигота по Аллелю 2	100% (95% ДИ: 98,9-100%)	100% (95% ДИ: 99,6-100%)
		-675 5G/4G в гене PAI-1	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,2-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 99,3-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
			Гомозигота по Аллелю 2	100% (95% ДИ: 98,5-100%)	100% (95% ДИ: 99,6-100%)
Буккальный соскоб	983	G20210A в гене F2	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,7-100%)	100% (95% ДИ: 85,4-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 77,9-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
			Гомозигота по Аллелю 2*	100% (95% ДИ: 65,2-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
		Arg506Gln в гене F5	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,7-100%)	100% (95% ДИ: 65,2-100%)
			Гетерозигота*	100% (95% ДИ: 36,8-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
			Гомозигота по Аллелю 2*	100% (95% ДИ: 47,3-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
		Arg353Gln в гене F7	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,5-100%)	100% (95% ДИ: 99,3-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 99,1-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
			Гомозигота по Аллелю 2	100% (95% ДИ: 95,9-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
		Val35Leu в гене F13A1	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,3-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 99,4-100%)	100% (95% ДИ: 99,4-100%)

		Гомозигота по Аллелю 2	100% (95% ДИ: 93,0-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	G-455A в гене FGB	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,3-100%)	100% (95% ДИ: 99,4-100%)
		Гетерозигота	100% (95% ДИ: 99,3-100%)	100% (95% ДИ: 99,4-100%)
		Гомозигота по Аллелю 2	100% (95% ДИ: 96,7-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
		Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,4-100%)	100% (95% ДИ: 99,3-100%)
	C807T в гене ITGA2	Гетерозигота	100% (95% ДИ: 99,2-100%)	100% (95% ДИ: 99,5-100%)
		Гомозигота по Аллелю 2	100% (95% ДИ: 97,1-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
		Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,1-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	Leu33Pro в гене ITGB3	Гетерозигота	100% (95% ДИ: 99,4-100%)	100% (95% ДИ: 99,4-100%)
		Гомозигота по Аллелю 2	100% (95% ДИ: 98,8-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
		Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,1-100%)	100% (95% ДИ: 99,6-100%)
	-675 5G/4G в гене PAI-1	Гетерозигота	100% (95% ДИ: 99,2-100%)	100% (95% ДИ: 99,4-100%)
		Гомозигота по Аллелю 2	100% (95% ДИ: 98,9-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
		Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 99,1-100%)	100% (95% ДИ: 99,6-100%)

* 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 G20210A в гене F2, Гетерозигота и Гомозигота по Аллелю 2 по полиморфизму Arg506Gln в гене F5 исследование более широкой выборки на данном этапе не представляется возможным.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б

7.1. Требования безопасности при работе с набором

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

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, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.

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 ТРОМБОФИЛИЯ** 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 ТРОМБОФИЛИЯ** для полного цикла исследования образцов.

9.4. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой

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

Анализ рисков показал, что возможными ошибками применения набора реагентов **КОМПЛЕКС ТРОМБОФИЛИЯ** 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» (ПУ № 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%
	K2-ЭДТА	1,8 мг/мл
	цитрат натрия	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 один стрип (по восемь пробирок А-Н). В каждой пробирке представлена амплификационная смесь для определения соответствующего полиморфизма в гене.

Расположение амплификационных смесей представлено на Рис. 2.

Рисунок 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	F2 G20210A											
B	F5 Arg506Gln											
C	F7 Arg353Gln											
D	F13A1 Val35Leu											
E	FGB G-455A											
F	ITGA2 C807T											
G	ITGB3 Leu33Pro											
H	PAI-1 -675 5G/4G											

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

10.1.3. В 8 пробирок стрипа с различными амплификационными смесями добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 5 мкл:

- а) в 8 пробирок стрипа для отрицательного контрольного образца (ОКО) – разбавитель;

б) в 8 пробирок стрипа для исследуемого образца – исследуемый образец ДНК;

в) в 8 пробирок стрипов для положительных контрольных образцов – ПКО «Тромбофилия» 11 и ПКО «Тромбофилия» 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 один стрип (по восемь пробирок А-Н). В каждой пробирке представлена реакционная смесь для определения соответствующего полиморфизма в гене.

Расположение реакционных смесей представлено на Рис. 3.

Рисунок 3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	F2 G20210A											
B	F5 Arg506Gln											
C	F7 Arg353Gln											
D	F13A1 Val35Leu											
E	FGB G-455A											
F	ITGA2 C807T											
G	ITGB3 Leu33Pro											
H	PAI-1 -675 5G/4G											

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

10.2.3. Внести в раставленные 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 8 пробирок стрипа с различными амплификационными смесями добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 5 мкл:

а) в 8 пробирок стрипа для отрицательного контрольного образца (ОКО) – разбавитель;

б) в 8 пробирок стрипа для исследуемого образца – исследуемый образец ДНК;

в) в 8 пробирок стрипов для положительных контрольных образцов – ПКО «Тромбофилия» 11 и ПКО «Тромбофилия» 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):

Таблица 4.

«CFX 96» (BioRad)	+80 °C	2 мин*	
	+94 °C	3 мин	
	+94 °C	15 сек	40 циклов
	+64 °C	40 сек (считывание по каналам FAM, HEX)	
«ДТ-96» (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 по каналам FAM, HEX)	
«LightCycler 96» (Roche)	+80 °C	120 сек*	
	+94 °C	180 сек	
	+94 °C	15 сек	40 циклов
	+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 ТРОМБОФИЛИЯ**, представлены на примере амплификатора с детекцией в режиме «реального времени» «CFX 96» (BioRad).

Во вкладке **Settings** выставить следующие настройки (Таблица 5):

Таблица 5.

Канал	Cycles to Analyze...	Baseline Setting
HEX	5 - 40	Apply Fluorescence 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.

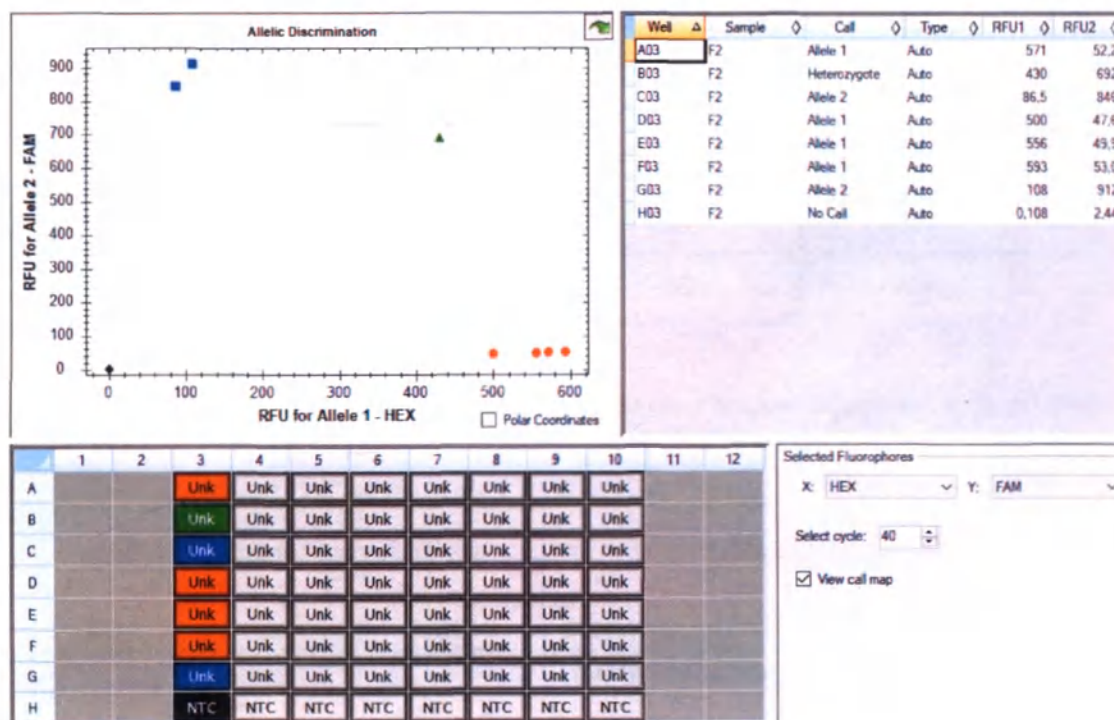
При наличии в постановке Контрольных образцов необходимо убедиться, что тип образца установлен правильно.

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

Пример представления результата анализа генотипирования по полиморфизму G20210A гена F2 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.

Рисунок 4.



11.2. Интерпретация результатов.

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 «Тромбофилия» 11 – Allele 1; ПКО «Тромбофилия» 22 – Allele 2.

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

Невалидные образцы (недостаточное количество анализируемой ДНК, наличие ингибиторов реакции в образце) будут интерпретироваться как *Undetermined*. В этом случае можно говорить о ненадлежащем качестве образца для исследования и необходимости повторной пробоподготовки.

Образцы, не прошедшие ПЦР с интерпретацией *No Call*, 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
F2 G20210A	G	A
F5 Arg506Gln	(Arg)G	(Gln)A
F7 Arg353Gln	(Arg)G	(Gln)A
F13A1 Val35Leu	(Val)G	(Leu)T
FGB G-455A	G	A
ITGA2 C807T	C	T
ITGB3 Leu33Pro	(Leu)T	(Pro)C
PAI-1 -675 5G/4G	5G	4G

Интерпретация результатов анализа с целью выявления и идентификации аллелей генов ДНК человека 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 ТРОМБОФИЛИЯ** варианта исполнения *SNP-SHOT OneStep-PB-96* должен храниться при температуре $-18...-20^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Срок годности набора – 6 месяцев.

Набор **КОМПЛЕКС ТРОМБОФИЛИЯ** варианта исполнения *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* должен храниться при температуре $+2...+8^{\circ}\text{C}$ 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 нескрытых реагентов.

12.2. Транспортирование

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

Для наборов реагентов **КОМПЛЕКС ТРОМБОФИЛИЯ** варианта исполнения *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* допустима транспортировка при температуре +18...+25 °С 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 1.2.3685-21.

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 клинико-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 ТРОМБОФИЛИЯ**, 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 14 ЛИСТОВ

«01» 10 202__ год



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

Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов
шт.



Директор
Наумов А.Ю.