БиоЛинк
лаборатория
генодиагностики

УТВЕРЖДАЮ
Директор
ООО «БИОЛИНК»
_____ Корниенко А.А.
«26» января 2024 г.

Набор реагентов для выявления мутации V617F в гене *JAK2* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени **"Real-time-PCR-JAK2-V617F"** по ТУ 21.20.23-009-57201404-2021

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Содержание

Содержание 1
Введение 3
1 Назначение набора 3
2 Характеристика набора 4
2.1 Варианты исполнения 4
2.2 Комплектность 4
2.3 Состав набора реагентов 4
2.4 Число анализируемых проб 5
2.5 Принцип действия набора 5
3 Аналитические и диагностические характеристики набора 6
3.1 Предел обнаружения 6
3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ 6
3.3 Характеристики аналитической эффективности 6
3.4 Диагностическая специфичность 7
3.5 Диагностическая чувствительность 7
3.6 Ограничения при применении 7
3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа 7
4 Риски, связанные с применением набора реагентов 7
5 Меры предосторожности 8
6 Оборудование и материалы 9
6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов 9
6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов 10
7 Анализируемые пробы 11
8 Подготовка компонентов для анализа 12
9 Проведение анализа 12
9.1 Постановка ПЦР на мутацию V617F гена *JAK2* 12
9.2 Программирование и запуск термоциклера 13
10 Анализ результатов 14
10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР 14
10.2 Оценка пригодности клинических образов ДНК 15
10.3 Анализ результатов ПЦР на наличие мутации V617F в гене *JAK2* 16
11 Условия хранения, транспортирования, эксплуатации и утилизации 16
11.1 Условия хранения 16
11.2 Условия транспортирования 16

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

11.3 Условия эксплуатации 17
11.4 Условия утилизации 17
12 Гарантийные обязательства 18
13 Маркировка 18
Библиография 19
Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel» 20
Обработка результатов для термоциклера «С1000 Touch» с модулем «CFX96» . 20
Обработка результатов для амплификатора «ДТпрайм» 22

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

Введение

Ген *JAK2* кодирует внутриклеточный белок JAK2, который относится к группе янус-тирозинкиназ и является компонентом сигнального каскада JAK-STAT, играющего важную роль в передаче сигналов от цитокинов [1].

Нарушение регуляции пути JAK-STAT приводит к увеличению пролиферации клеток-предшественниц миелоидного ростка кроветворения и связано с развитием миелопролиферативных заболеваний: истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии, первичного миелофиброза. Активирующая мутация V617F в гене *JAK2* встречается в 96% случаев при истинной полицитемии, в 55% случаев при эссенциальной тромбоцитемии и в 45-68% случаев при первичном миелофиброзе. При истинной полицитемии встречаются также мутации в 12-м экзоне гена *JAK2* [2, 3]. Руксолитиниб, ингибитор JAK2, показан для лечения больных истинной полицитемией, резистентных к терапии гидроксикарбамидом.

Молекулярно-генетическое исследование на наличие мутации V617F в гене *JAK2* рекомендовано при диагностике миелопролиферативных заболеваний и миелодиспластического синдрома [4, 5].

Показания и противопоказания к применению

Показания: сопутствующая диагностика миелопролиферативных заболеваний и миелодиспластического синдрома. Противопоказания: при применении по назначению специально обученным персоналом противопоказания отсутствуют.

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения мутации V617F в гене *JAK2* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Функциональное назначение: сопутствующая диагностика; пациентам с миелодиспластическим синдромом, протекающим с фиброзом стромы, рекомендуется молекулярно-генетическое исследование крови для выявления мутаций в гене *JAK2*, определения прогноза заболевания и выбора тактики терапии.

Материалом для проведения ПЦР является ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной венозной крови. Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

Демографические и популяционные аспекты применения: без ограничений. Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

Требования к квалификации пользователей: только квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики (врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник).

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

2 Характеристика набора

2.1 Варианты исполнения

«Набор реагентов для выявления мутации V617F в гене *JAK2* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-JAK2-V617F" по ТУ 21.20.23-009-57201404-2021» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в двух вариантах исполнения:

1) Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-JAK2-V617F (12)";
2) Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-JAK2-V617F (36)".

2.2 Комплектность

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт качества.

2.3 Состав набора реагентов

Таблица 1. Состав набора реагентов

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объём реагента	
			на 12 реакции	на 36 реакций
1	Жёлтый	ПЦР-смесь JAK2 V617F	250 мкл	750 мкл
2	Синий	Taq ДНК-полимераза	20 мкл	30 мкл
3	Красный	ПКО	70 мкл	200 мкл
4	Белый	ОКО	70 мкл	200 мкл

ПЦР-смесь JAK2 V617F – готовая к применению ПЦР-смесь без Taq ДНК-полимеразы для амплификации фрагмента гена *JAK2* с мутацией V617F. ПЦР-смесь содержит буфер для ПЦР, деионизированную воду, синтетические олигонуклеотиды и флуоресцентные зонды.

Taq ДНК-полимераза – высокоочищенный рекомбинантный фермент Taq ДНК-полимераза.

ПКО – положительный контрольный образец, содержащий ДНК с фрагментом гена *JAK2* с мутацией V617F и ДНК человека без мутаций гена *JAK2*.

ОКО – отрицательный контрольный образец, содержащий воду без нуклеаз.

Набор реагентов не содержит материалов человеческого или животного происхождения, которые можно считать потенциально заражёнными, а также не содержит опасных химических веществ.

Компоненты набора в рабочих концентрациях не токсичны, не обладают канцерогенным и мутагенным действием.

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

2.4 Число анализируемых проб

Набор реагентов на 12 реакции "Real-time-PCR-JAK2-V617F (12)" содержит реактивы для проведения 12 реакций, что позволяет проанализировать в одной постановке четыре клинических образца, положительный и отрицательный контроль (все образцы в дублях).

Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-JAK2-V617F (36)" содержит реактивы для проведения 36 реакций, что позволяет проанализировать 12 клинических образцов в трёх постановках по четыре клинических образца с положительным и отрицательным контролем (все образцы в дублях) или 16 клинических образцов с положительным и отрицательным контролем в одной постановке (все образцы в дублях).

2.5 Принцип действия набора

Принцип действия набора реагентов основан на методе аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с детекцией сигнала с помощью TaqMan зондов.

В состав набора входит смесь для ПЦР, которая содержит все необходимые реагенты за исключением Taq ДНК полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке.

ПЦР-смесь JAK2 V617F содержит реагенты для контрольной реакции и аллель-специфичной реакции. Мишенью для контрольной реакции является константный участок ДНК гена *JAK2*. Продукты этой реакции детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором HEX. В аллель-специфичной реакции происходит избирательная амплификация фрагмента ДНК гена *JAK2*, содержащего мутацию V617F, за счёт использования праймера, который комплементарен последовательности ДНК с этой мутацией. Продукты этой реакции детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM.

Для контроля качества набора в его состав входят положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО). ПКО содержит ДНК с фрагментом гена *JAK2* с мутацией V617F и ДНК человека без мутаций гена *JAK2*. ОКО содержит воду без нуклеаз. В каждом эксперименте используют ПКО и ОКО. Все исследуемые и контрольные образцы тестируют в дублях.

В аллель-специфичной реакции величина Ct для образцов ДНК, содержащих ген *JAK2* без мутации, на несколько циклов выше, чем величина Ct, для образцов ДНК, содержащих ген *JAK2* с мутацией V617F. Наличие мутации в образце ДНК определяется по разнице между значениями Ct по каналу FAM и по каналу HEX.

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

3 Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 1% ДНК с мутацией V617F гена *JAK2* на фоне ДНК гена *JAK2* без мутаций.

Минимальное количество ДНК, необходимое для проведения анализа, составляет 20 мкл с концентрацией 2 нг/мкл (600 копий гена *JAK2* в 1 мкл).

3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ

Под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов специфически определять наличие мутации V617F в гене *JAK2* на фоне ДНК гена *JAK2* без мутаций, что обеспечивается с помощью специфически подобранных праймеров и зондов, проверенных на контрольных образцах. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации для образцов ДНК, несущих ген *JAK2* без мутации V617F.

Аналитическая специфичность целевых участков гена *JAK2* подтверждена *in silico* с помощью ресурса BLAST (*https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi*).

К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец ДНК, относятся следующие вещества: гемоглобин, общий белок крови, триглицериды, билирубин, присутствующие в образце ДНК в результате неполного удаления в ходе выделения ДНК из крови.

Интерферирующие вещества не влияют на результаты анализа в следующих концентрациях: альбумин – 51 мг/мл, билирубин – 35,1 мкмоль/л, гемоглобин – 5 мг/мл, триглицериды – 34,23 ммоль/л.

3.3 Характеристики аналитической эффективности

Повторяемость оценивали в условиях, при которых независимые результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, одним оператором, в пределах короткого промежутка времени. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутации V617F гена *JAK2*. Значение повторяемости результатов при определении мутации V617F гена *JAK2* составило 100% (интервал 90,26-100% с доверительной вероятностью 95%).

Воспроизводимость оценивали в условиях, при которых результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, двумя операторами, с использованием различного оборудования, в разные дни. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутации V617F гена

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

JAK2. Значение воспроизводимости результатов при определении при определении мутации V617F гена *JAK2* составило 100% (интервал 90,26-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.4 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении мутации V617F гена *JAK2* в клинических испытаниях на выборке из 70 образцов составила 100% (интервал 88,43-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.5 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении мутации V617F гена *JAK2* в клинических испытаниях на выборке из 70 образцов составила 100% (интервал 91,19-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.6 Ограничения при применении

Пригодность ДНК для анализа на наличие мутаций гена *JAK2* оценивается в ПЦР по значению Ct по каналу HEX. Если значение Ct образца по каналу HEX превышает допустимые значения, то концентрация ДНК не достаточна, и результаты анализа не валидны. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа

Референтный метод анализа на наличие мутаций гена *JAK2* – секвенирование по Сэнгеру. Референтные материалы отсутствуют. Набор сравнения: «Набор реагентов для проведения ПЦР в реальном времени для количественного выявления мутации V617F в 14 экзоне гена *JAK2* киназы (Jak2V617F-тест) по ТУ 9398-003-58167147-2012» (ООО «ГеноТехнология», Россия).

4 Риски, связанные с применением набора реагентов

Перечень опасных ситуаций, которые относятся к категории R2 «допустимый риск», зависят от человеческого фактора и не могут быть уменьшены производителем другим способом, кроме как добавлением соответствующей информации в инструкцию по применению.

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

1. Деградация компонентов ПЦР-смеси или ПКО, инактивация фермента Taq ДНК-полимеразы из-за нарушения условий хранения и транспортировки или при использовании набора реагентов после истечения срока годности (возможный вред: отсутствие результата).
2. Образец ДНК не добавлен в ПЦР-смесь из-за ошибки при постановке ПЦР, в случае, когда персонал анализирует образцы ДНК без дублей (возможный вред: отсутствие результата).
3. Интерпретация не валидных результатов ПЦР в случае, когда персонал не использует контрольные образцы при постановке ПЦР или не учитывает критерии достоверности (возможный вред: ложноотрицательный результат, ложноположительный результат).
4. Смещение сигналов флуоресценции из-за использования неверного значения для порогового уровня флуоресценции при анализе данных ПЦР (возможный вред: ложноотрицательный результат).

Совокупный остаточный риск является допустимым.

Противопоказания отсутствуют. Ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты, связанные с применением медицинского изделия по назначению, отсутствуют.

5 Меры предосторожности

1. Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2б согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.
2. Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.
3. Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
4. Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
5. Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
6. При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
7. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

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

8. При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.
9. Использовать только ПЦР-смесь и Taq ДНК-полимеразу, входящие в состав набора реагентов.
10. Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
11. Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
12. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
13. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно следует подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами СанПиН 3.3686-21.
14. Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
15. Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

6 Оборудование и материалы

6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Амплификатор планшетного типа с детекцией флуоресценции в режиме реального времени:

Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 в следующих модификациях: 4М1, 4М3, 4М6, 5М1, 5М3, 5М6, 6М1, 6М3, 6М6, 4Х1, 5Х1, 6Х1 (РУ № ФСР 2011/10229, ООО «НПО ДНК-Технология») или термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, исполнения: «C1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (РУ №ФСЗ 2008/01792, «Био-Рад Лабораториез, Инк.», США).

Бокс для ПЦР, например, бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.» по ТУ

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

9443-004-51495026-2004 (РУ № ФСР 2010/07114, ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

Вортекс, например, вортекс персональный V-1 plus (РУ № ФСЗ 2011/09797, ООО «Биосан», Латвия).

Дозаторы переменного объема, например, дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Блэк» по ТУ 9443-008-33189998-2009 (РУ № ФСР 2009/05681, АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия).

Компьютер с операционной системой Windows XP Professional SP3 или Windows 7 и выше, жёстким диском не менее 10 ГБ, тактовой частотой процессора не менее 2.0 ГГц, оперативной памятью не менее 1 ГБ, разрешением экрана не менее 1024*768, программным обеспечением Microsoft Office Excel версии 2003 или выше.

Термостат твердотельный, например, термостат типа «Драй-блок» TDB-120, вариант исполнения: I. Термостат TDB-120 с крышкой и термоблоком А-53 (РУ № РЗН 2018/7729, ООО «Биосан», Латвия).

Холодильник бытовой с холодильной (от 2°С до 8°С) и морозильной камерами (от минус 18°С до минус 25°С) (например, ATLANT XM-6023-031 «ATLANT», Белоруссия).

Центрифуга, например, центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000 с принадлежностями: ротор R-2, ротор R-6, ротор R-12/10, ротор R-12/15 (РУ № ФСЗ 2008/01792, ООО «Биосан», Латвия).

6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

Контейнер для сброса отходов («КМ-ПРОЕКТ», Россия).

Набор реагентов для предварительной обработки цельной крови, например, «Реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови «ГЕМОЛИТИК» по ТУ 9398-097-01897593-2010» (РУ № ФСР 2010/09505, «ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия) или «Набор реагентов для предварительной обработки цельной периферической крови "РеалБест Гемолитик" по ТУ 9398-492-23548172-2013» (РУ № РЗН 2015/2861, АО «Вектор Бест», Россия).

Набор реагентов для выделения ДНК из крови, зарегистрированный в РФ, например, «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала "РИБО-преп" по ТУ 9398-071-01897593-2008», (РУ № ФСР 2008/03147, «ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия).

Наконечники универсальные, например, наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и

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

роботизированных систем. 3. Наконечники универсальные для дозаторов с фильтром объёмом от 0,1 мкл до 1000 мкл (РУ № ФСЗ 2012/12077, «Эксиджен, Инк.», США).

Перчатки медицинские, например, перчатки медицинские диагностические (смотровые) и хирургические одноразовые "Benovy" стерильные и нестерильные. Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные смотровые, цвета: бирюзовый, синий, белый, голубой, сиреневый, зеленый, размеры: XS, S, M, L, XL (вид 185830) (РУ № ФСЗ 2012/12488, «ТГ Медикал Сдн. Бхд.», Малайзия).

Пробирки, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro. 13. Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом от 0,6 мл до 2,0 мл или 17. плашки для ПЦР на 96 лунок («РУ № ФСЗ 2012/11892, Эксиджен, Инк.», США).

Штатив, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro. Вариант исполнения 23. Штатив для пробирок, 80 ячеек (РУ № ФСЗ 2009/05024, «Эксиджен, Инк.», США).

7 Анализируемые пробы

В качестве материала для проведения ПЦР используют клинические образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов цельной венозной крови.

Для выделения ДНК из цельной крови используют зарегистрированные в РФ наборы реагентов. Рекомендуется провести предварительную обработку цельной крови с использованием набора реагентов для селективного лизиса эритроцитов крови, например, «Реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови «ГЕМОЛИТИК» по ТУ 9398-097-01897593-2010» (РУ № ФСР 2010/09505, «ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора») или «Набор реагентов для предварительной обработки цельной периферической крови "РеалБест Гемолитик" по ТУ 9398-492-23548172-2013» (РУ № РЗН 2015/2861, АО «Вектор Бест», Россия). Затем провести экстракцию нуклеиновых кислот с помощью набора «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008» (РУ № ФСР 2008/03147, «ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора»).

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к набору для выделения ДНК.

ВНИМАНИЕ! Образцы крови хранить до момента выделения ДНК при температуре от 2°С до 8°С не более 48 часов. Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

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

8 Подготовка компонентов для анализа

ПЦР-смесь JAK2 V617F, ПКО и ОКО разморозить при комнатной температуре (от 18°С до 25°С) или при 37°С, убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 1-2 сек при 1000 об/мин., чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

ВНИМАНИЕ! После приготовления смесей для ПЦР немедленно поместить оставшиеся реагенты в морозильную камеру с температурой минус 20°С.

ВНИМАНИЕ! Помимо клинических образцов ДНК в каждой постановке необходимо использовать ПКО и ОКО, входящие в состав набора реагентов, все образцы тестировать в дублях.

9 Проведение анализа

9.1 Постановка ПЦР на мутацию V617F гена *JAK2*

9.1.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ОКО и ПКО. Состав реакционной смеси на 1 реакцию приведен в таблице 2, для тестирования N клинических образцов в дублях это количество необходимо умножить на (2N + 5).

Таблица 2. Количество реагентов на одну реакцию

Реагент	Количество
ПЦР-смесь (без полимеразы)	19,8 мкл
Taq ДНК-полимераза	0,2 мкл

9.1.2 ПЦР-смесь JAK2 V617F (пробирка №1, жёлтая крышка), ПКО (пробирка №3, красная крышка) и ОКО (пробирка №4, белая крышка) разморозить при комнатной температуре (от 18°С до 25°С) или при 37°С. Убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и кратко центрифугировать, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

9.1.3 Приготовить реакционную смесь в пробирке объёмом 1,5 мл согласно расчёту (пункт 9.1.1): внести в пробирку расчётное количество ПЦР-смеси JAK2 V617F, добавить Taq ДНК-полимеразу. Перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс) и центрифугировать 5 сек в мини-центрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирки. Реакционная смесь готова.

ВНИМАНИЕ! Использовать немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходной

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

ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы немедленно поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°С.

Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок. ВНИМАНИЕ! Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать стрипы на крышках!

Пример расположения клинических и контрольных образцов при анализе шести образцов ДНК в дублях с использованием стрипов по восемь пробирок приведен на рисунке 1.

Клинические образцы ДНК						**Образцы из набора**	
ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО

Рисунок 1. Схема расположения шести образцов ДНК и контрольных образцов в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок. Указаны, номера образцов ДНК, ОКО и ПКО

9.1.4 Добавить в пробирки по 20 мкл готовой реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой в соответствии со схемой и закрыть крышки.

9.1.5 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

– по 5 мкл клинических образцов ДНК в соответствующие пробирки;

– по 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;

– по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

Каждую пробирку открывать перед добавлением образца и закрывать сразу после добавления.

9.1.6 Закрыть крышки и перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

9.1.7 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

9.1.8 Установить стрипы в блок термоциклера.

9.2 Программирование и запуск термоциклера

9.2.1 Запрограммировать термоциклер для проведения ПЦР и детекции флуоресценции в соответствии с руководством по эксплуатации и п. 9.2.2-9.2.4.

9.2.2 Задать объём реакционной смеси 25 мкл. Запрограммировать протокол проведения ПЦР в соответствии с таблицей 3.

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

Таблица 3. Протокол ПЦР в реальном времени

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	3 мин	Нет
10	Денатурация	95°C	10 сек	
	Отжиг праймеров	61°C	30 сек	
40	Денатурация	95°C	10 сек	
	Отжиг праймеров, элонгация	61°C	30 сек	Да

9.2.3 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

– HEX – регистрация сигнала при амплификации константного участка гена *JAK2*;

– FAM – регистрация сигнала при амплификации фрагмента гена *JAK2* с мутацией V617F.

9.2.4 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

9.2.5 Запустить протокол ПЦР.

10 Анализ результатов

10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

10.1.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для каждого образца определить значение порогового цикла (Ct) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает пороговый уровень (threshold level). Для получения величин Ct использовать логарифмическую шкалу и выставить вручную пороговый уровень 100.

10.1.2 Проверить значения Ct по каналам HEX и FAM последовательно для ОКО, ПКО и клинических образцов ДНК.

10.1.3 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *JAK2* только в том случае, если величины Ct для ОКО и ПКО имеют допустимые значения (таблица 4):

– для ОКО в ПЦР не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и HEX не определяется значение Ct_{FAM}, Ct_{HEX} либо Ct_{FAM}, Ct_{HEX} больше $Ct_{ПКО}+6$ ($Ct_{ПКО}$ – значение Ct ПКО по тому же каналу);

– для ПКО в ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение $Ct_{ПКО}$ меньше или равно значению QC_{FAM} для соответствующего амплификатора;

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

– для ПКО в ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу HEX и определяется значение $Ct_{ПКО}$ меньше или равно значению QC_{HEX} для соответствующего амплификатора;

Таблица 4. Допустимые значения Ct для контрольных образцов

Допустимое значение Ct для образца	
ОКО	**ПКО**
$\mathbf{Ct_{HEX}}$ не определено или $\mathbf{Ct_{HEX}} > Ct_{ПКО}+6$ $\mathbf{Ct_{FAM}}$ не определено или $\mathbf{Ct_{FAM}} > Ct_{ПКО}+6$	$\mathbf{Ct_{HEX}} \leq QC_{HEX}$[1] $\mathbf{Ct_{FAM}} \leq QC_{FAM}$[1]

[1)] Значения QC_{HEX} и QC_{FAM} для каждого амплификатора («CFX96» и «ДТпрайм») указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте качества.

10.1.4 Если величины Ct контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если после повторного анализа значения Ct не соответствуют допустимым пределам, то результаты анализа не валидны. Возможные проблемы представлены в таблице 5.

Таблица 5. Другие значения Ct для контрольных образцов и возможные проблемы

Образец	**Значение Ct**	**Возможные проблемы**
ОКО	$\mathbf{Ct_{HEX}} \leq Ct_{ПКО}+6$ $\mathbf{Ct_{FAM}} \leq Ct_{ПКО}+6$	Возможна контаминация.
ПКО	$\mathbf{Ct_{HEX}} > QC_{HEX}$ $\mathbf{Ct_{FAM}} > QC_{FAM}$	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.

10.2 Оценка пригодности клинических образов ДНК

10.2.1 Сравнить значения Ct по каналу HEX для каждого из клинических образцов ДНК (Ct_{HEX}) со значением Ct ПКО ($Ct_{ПКО}$).

10.2.2 Если значение $Ct_{HEX} \leq Ct_{ПКО}+4$, то концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутации V617F в гене *JAK2*.

10.2.3 Если значение Ct_{HEX} не определено или $Ct_{HEX} > Ct_{ПКО}+4$, то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутации V617F в гене *JAK2*. Необходимо повторить выделение ДНК.

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

10.3 Анализ результатов ПЦР на наличие мутации V617F в гене *JAK2*

10.3.1 Для каждого клинического образца необходимо рассчитать значение $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{HEX}$, где Ct_{FAM} – значение Ct исследуемого образца по каналу FAM, Ct_{HEX} – значение Ct исследуемого образца по каналу HEX. Рекомендации по расчёту ΔCt в программе «MS Office Excel» приведены в приложении А.

10.3.2 Сравнить полученные значения ΔCt клинического образца ДНК со значением точки отсечения (ТО) для мутации V617F ($ТО_{V617F}$). Значение $ТО_{V617F}$ для каждого амплификатора указано на упаковке набора реагентов и в паспорте качества.

10.3.3 Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию V617F в гене *JAK2*), если для обоих дублей значения ΔCt меньше или равны значению $ТО_{V617F}$.

10.3.4 Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию V617F в гене *JAK2* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей значения ΔCt больше $ТО_{V617F}$, или если значения Ct_{FAM} не определены или для одного из дублей значение ΔCt больше $ТО_{V617F}$, а для другого – значение Ct_{FAM} не определено.

10.3.5 Если для одного из дублей значение ΔCt меньше или равно $ТО_{V617F}$, а для другого ΔCt больше $ТО_{V617F}$, то результат считают сомнительным и анализ повторяют.

11 Условия хранения, транспортирования, эксплуатации и утилизации

11.1 Условия хранения

11.1.1 Хранить набор реагентов при температуре от минус 18°С до минус 25°С в течение всего срока годности в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, не допуская проникновения света.

11.1.2 Не подвергать набор реагентов замораживанию и размораживанию более трёх раз, общее время нахождения после оттаивания при температуре 22°С – не более 30 минут.

11.1.3 Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска или 3 месяца после первого вскрытия упаковки набора в зависимости от того, какая дата наступит раньше.

11.2 Условия транспортирования

11.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре не выше минус 18°С.

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

11.2.2 Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы (ХТЛ-4, ООО «Термологика» или аналогичные).

11.2.3 Срок транспортирования – не более 5 суток.

11.2.4 При транспортировании необходимо соблюдать условия, обеспечивающие сохранность набора реагентов от механического повреждения, неблагоприятного воздействия температуры окружающей среды, воздействия солнечного света.

ВНИМАНИЕ! Если реагенты прибыли незамороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «БиоЛинк» (см. раздел 12).

11.3 Условия эксплуатации

11.3.1 Использовать набор реагентов при комнатной температуре (от 18°С до 25°С).

11.3.2 Строго соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

11.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

11.4 Условия утилизации

11.4.1 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПиН 2.1.3684-21.

11.4.2 При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, реагентов и оборудования.

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

12 Гарантийные обязательства

12.1 Гарантии производителя

Производитель гарантирует соответствие качества набора реагентов требованиям нормативной и технической документации при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

12.2 Рекламации

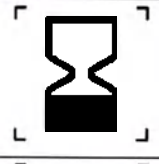
Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действий третьих лиц, либо обстоятельств непреодолимой силы.

Рекламации следует направлять в письменном виде производителю ООО «БиоЛинк».

Адрес:	630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13
Телефон:	+7 (383) 209-32-40
Электронная почта:	info@biolinklab.ru
Веб-сайт:	biolinklab.ru

13 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Не допускать воздействия солнечного света		Дата изготовления (месяц, год)
	Обратитесь к инструкции по применению		Использовать до (месяц, год)
	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Изготовитель

Вариант 1: REF 22301, Вариант 2: REF 22302

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

Библиография

1. Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins / K. Shuai, A. Ziemiecki, A. F. Wilks, et al. // Nature. – 1993. – Vol. 366. – P. 580-583. – DOI: 10.1038/366580a0
2. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. / A. Pardanani, T. L. Lasho, C. Finke, et al. // Leukemia. – 2007. – Vol. 21. – P. 1960-1963. – DOI: 10.1038/sj.leu.2404810
3. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2V617F mutation status: a prospective study. / P.J. Campbell, L.M. Scott, G. Buck, et al. // Lancet. – 2005. – Vol. 366. – P. 1945-1953. – DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67785-9
4. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии, первичного миелофиброза) (редакция 2020 г.) / А.Л. Меликян, А.М. Ковригина, И.Н. Суборцева и др. // Клиническая онкогематология. – 2021. – Т. 14 (2). – С. 262-298.
5. Клинические рекомендации. Миелодиспластический синдром. / Ассоциация онкологов России. Национальное гематологическое общество. // Год утверждения (частота пересмотра): 2020. – ID: 141– 86 с.

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

Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel»

Обработка результатов для термоциклера «C1000 Touch» с модулем «CFX96»

Экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel». При необходимости выполнить сортировку.

Добавить новые столбцы «Ct FAM» и «Ct HEX». Скопировать значения Ct по каналу FAM в столбце «Cq» (рисунок А1, элемент 2) и вставить в сформированный столбец «Ct FAM» (рисунок А1, элемент 3). Скопировать значения Ct по каналу HEX в столбце «Cq» (рисунок А1, элемент 2) и вставить в сформированный столбец «Ct HEX» (рисунок А1, элемент 4) таким образом, чтобы значения Ct_{FAM} и Ct_{HEX} для каждого образца находились в одной строке, соответствующей этому образцу.

Добавить столбец «ΔCt». Используя функцию вычитания, для каждого образца рассчитать значение $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{HEX}$ (рисунок А1, элемент 5).

Добавить столбец «ТО», внести значение $ТО_{V617F}$ для термоциклера «CFX96», указанное на упаковке набора и в паспорте качества (рисунок А1, элемент 6).

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔCt клинических образцов ДНК со значением $ТО_{V617F}$ и записать результат (рисунок А1, элемент 7).

Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию V617F в гене *JAK2*), если для обоих дублей значения ΔCt меньше или равны значению $ТО_{V617F}$.

Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию V617F в гене *JAK2* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей значения ΔCt больше $ТО_{V617F}$ или если значения Ct_{FAM} не определены или для одного из дублей значение ΔCt больше $ТО_{V617F}$, а для другого – значение Ct_{FAM} не определено.

Если для одного из дублей значение ΔCt меньше или равно $ТО_{V617F}$, а для другого ΔCt больше $ТО_{V617F}$, то результат считают сомнительным, необходимо повторить анализ.

В приведённом на рисунке А1 примере $ТО_{V617F} = 10,7$.

Образцы ДНК2 и ДНК3 учитываются как отрицательные, то есть, не содержащие мутацию V617F в гене *JAK2* (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку для образца ДНК2 в одном случае значение Ct_{FAM} не определено (N/A), а в другом случае ΔCt равно 16,1 (больше $ТО_{V617F} = 10,7$), для образца ДНК3 значения ΔCt составляют 17,1 и 16,0 (больше $ТО_{V617F} = 10,7$).

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

Образцы ДНК4 и ДНК5 учитываются как положительные, содержащие мутацию V617F в гене *JAK2*, так как значения ΔCt для образца ДНК 4 составляют 3,4 и 3,3, для образца ДНК5 составляют 2,1 и 2,2, то есть для обоих дублей значения ΔCt меньше значения TO_{V617F} = 10,7.

		1	2			3	4	5	6	7
Fluor	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Ct FAM	Ct HEX	ΔCt	TO	Результат
FAM	Unkn-02	ДНК2	N/A	0,0	0,0	N/A	17,9	#ЗНАЧ!	10,7	отрицательный
FAM	Unkn-02	ДНК2	34,8	34,8	0,0	34,8	18,7	16,1	10,7	отрицательный
FAM	Unkn-03	ДНК3	34,2	33,7	0,7	34,2	17,1	17,1	10,7	отрицательный
FAM	Unkn-03	ДНК3	33,2	33,7	0,7	33,2	17,3	16,0	10,7	отрицательный
FAM	Unkn-04	ДНК4	21,2	21,4	0,3	21,2	17,8	3,4	10,7	положительный
FAM	Unkn-04	ДНК4	21,6	21,4	0,3	21,6	18,3	3,3	10,7	положительный
FAM	Unkn-05	ДНК5	19,8	19,9	0,1	19,8	17,7	2,1	10,7	положительный
FAM	Unkn-05	ДНК5	20,0	19,9	0,1	20,0	17,8	2,2	10,7	положительный
FAM	Neg Ctrl-01	ОКО	31,0	31,5	0,6					
FAM	Neg Ctrl-01	ОКО	31,9	31,5	0,6					
FAM	Pos Ctrl-01	ПКО	25,8	26,0	0,2					
FAM	Pos Ctrl-01	ПКО	26,2	26,0	0,2					
HEX	Unkn-02	ДНК2	17,9	18,3	0,4					
HEX	Unkn-02	ДНК2	18,7	18,3	0,4					
HEX	Unkn-03	ДНК3	17,1	17,2	0,1					
HEX	Unkn-03	ДНК3	17,3	17,2	0,1					
HEX	Unkn-04	ДНК4	17,8	18,0	0,3					
HEX	Unkn-04	ДНК4	18,3	18,0	0,3					
HEX	Unkn-04	ДНК5	17,7	17,7	0,1					
HEX	Unkn-05	ДНК5	17,8	17,7	0,1					
HEX	Neg Ctrl-01	ОКО	13,3	13,6	0,5					
HEX	Neg Ctrl-01	ОКО	14,0	13,6	0,5					
HEX	Pos Ctrl-01	ПКО	16,6	16,5	0,2					
HEX	Pos Ctrl-01	ПКО	16,3	16,5	0,2					

Рисунок А1. Обработка данных в программе «MS Office Excel»

1 – в столбце «Sample» обозначены номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.

2 – столбец «Cq», откуда скопированы значения Ct по каналу FAM и по каналу HEX.

3– столбец «Ct FAM», в который вставлены значения Ct по каналу FAM из столбца «Cq».

4– столбец «Ct HEX», в который вставлены значения Ct по каналу HEX из столбца «Cq».

5 – вычисление значений ΔCt по формуле $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{HEX}$.

6 – значение TO_{V617F} для термоциклера «CFX96» (указано на упаковке набора и в паспорте качества).

7 – результат анализа на наличие мутации V617F в гене *JAK2*.

Cq Mean – среднее значение Cq для образца,

Cq Std. Dev – среднеквадратическое отклонение значения Cq для образца.

Значения Cq Mean и Cq Std. Dev не используются при расчётах.

N/A – значение не определено, #ЗНАЧ! – ошибка в значении.

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

Обработка результатов для амплификатора «ДТпрайм»

Экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel». При необходимости выполнить сортировку. Столбец «result» (рисунок А2, элемент 4) экспортируется автоматически из программного обеспечения амплификатора «ДТпрайм». Его следует игнорировать при анализе результатов или удалить.

Добавить столбец «ΔCt». Используя функцию вычитания, для каждого образца рассчитать значение $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{HEX}$ (рисунок А2, элемент 5).

Добавить столбец «ТО», внести значение TO_{V617F} для амплификатора «ДТпрайм», указанное на упаковке набора и в паспорте качества (рисунок А2, элемент 6).

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔCt клинических образцов ДНК со значением TO_{V617F} и записать результат (рисунок А2, элемент 7).

Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию V617F в гене *JAK2*), если для обоих дублей значения ΔCt меньше или равны значению TO_{V617F}.

Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию V617F в гене *JAK2* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей значения ΔCt больше TO_{V617F} или если значения Ct_{FAM} не определены или для одного из дублей значение ΔCt больше TO_{V617F}, а для другого – значение Ct_{FAM} не определено.

Если для одного из дублей значение ΔCt меньше или равно TO_{V617F}, а для другого ΔCt больше TO_{V617F}, то результат считают сомнительным, необходимо повторить анализ.

В приведённом на рисунке А2 примере $TO_{V617F} = 11,1$.

Образцы 1 и 2 учитываются как отрицательные, то есть, не содержащие мутацию V617F в гене *JAK2* (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку для образца 1 в одном случае значение Ct_{FAM} не определено, а в другом случае ΔCt равно 16,8 (больше $TO_{V617F} = 11,1$), для образца 2 значения ΔCt составляют 22,09 и 22,96 (больше $TO_{V617F} = 11,1$).

Образцы 3 и 4 учитываются как положительные, содержащие мутацию V617F в гене *JAK2*, так как значения ΔCt для образца 3 составляют 8,5 и 9,4, а для образца 4 составляют 9,1 и 8,9, то есть для обоих дублей значения ΔCt меньше значения $TO_{V617F} = 11,1$.

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

1	2	3	4	5	6	7
id	Fam	Hex	result	ΔCt	TO	Результат
Образец_1		8,7	-	#ЗНАЧ!	11,1	отрицательный
Образец_1	25,9	9,1	+	16,8	11,1	отрицательный
Образец_2	34,2	12,1	+	22,09	11,1	отрицательный
Образец_2	33,2	12,3	+	20,96	11,1	отрицательный
Образец_3	20	11,5	+	8,5	11,1	положительный
Образец_3	20,5	11,1	+	9,4	11,1	положительный
Образец_4	20,8	11,7	+	9,1	11,1	положительный
Образец_4	20,7	11,8	+	8,9	11,1	положительный
K+	20,3	11,8	+			
K+	20,4	11,5	+			
K-			нд			
K-			нд			

Рисунок В2. Обработка данных в программе «MS Office Excel»

1 – в столбце «id» обозначены номера образцов ДНК, ПКО (К+) и ОКО (К-).

2 – столбец «Fam», значения Ct образцов по каналу FAM.

3 – столбец «Hex», значения Ct образцов по каналу HEX.

4 – столбец «result» необходимо игнорировать.

5 – вычисление значений ΔCt по формуле $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{HEX}$.

6 – значение TO_{V617F} для амплификатора «ДТпрайм» (указано на упаковке набора и в паспорте качества).

7 – результат анализа на наличие мутации V617F в гене *JAK2*.

#ЗНАЧ! – ошибка в значении

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

Производитель: ООО «БиоЛинк»

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: (383) 209-32-40

E-mail: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru

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

Прошито, пронумеровано
и скреплено печатью
25 листов
Директор ООО «БИОЛИНК»
/ Корниенко А. А. /
«26» 01 2024 г.

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

Приложение 3

УТВЕРЖДАЮ
Директор

ООО «БИОЛИНК»

_____А.А. Корниенко
«29» февраля 2024г.

М.П.

СОГЛАСОВАНО
Директор клинических исследований и дополнительных сервисов Дирекции ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»

_____ Я.Э. Новикова
«29» февраля 2024г.

М.П.

Инструкция по применению медицинского изделия для диагностики in vitro

«Набор реагентов для выявления мутации V617F в гене *JAK2* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-JAK2-V617F" по ТУ 21.20.23-009-57201404-2021», производства ООО «БИОЛИНК», Россия

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

УТВЕРЖДАЮ
Директор
ООО «БИОЛИНК»
_____ Корниенко А.А.
«26» января 2024 г.

Набор реагентов для выявления мутации V617F в гене *JAK2* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени **"Real-time-PCR-JAK2-V617F"** по ТУ 21.20.23-009-57201404-2021

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

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

Содержание

Содержание 1
Введение 3
1 Назначение набора 3
2 Характеристика набора 4
2.1 Варианты исполнения 4
2.2 Комплектность 4
2.3 Состав набора реагентов 4
2.4 Число анализируемых проб 5
2.5 Принцип действия набора 5
3 Аналитические и диагностические характеристики набора 6
3.1 Предел обнаружения 6
3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ 6
3.3 Характеристики аналитической эффективности 6
3.4 Диагностическая специфичность 7
3.5 Диагностическая чувствительность 7
3.6 Ограничения при применении 7
3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа 7
4 Риски, связанные с применением набора реагентов 7
5 Меры предосторожности 8
6 Оборудование и материалы 9
6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов 9
6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов 10
7 Анализируемые пробы 11
8 Подготовка компонентов для анализа 12
9 Проведение анализа 12
9.1 Постановка ПЦР на мутацию V617F гена *JAK2* 12
9.2 Программирование и запуск термоциклера 13
10 Анализ результатов 14
10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР 14
10.2 Оценка пригодности клинических образов ДНК 15
10.3 Анализ результатов ПЦР на наличие мутации V617F в гене *JAK2* 16
11 Условия хранения, транспортирования, эксплуатации и утилизации 16
11.1 Условия хранения 16
11.2 Условия транспортирования 16

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

11.3 Условия эксплуатации 17
11.4 Условия утилизации 17
12 Гарантийные обязательства 18
13 Маркировка 18
Библиография 19
Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel» 20
Обработка результатов для термоциклера «С1000 Touch» с модулем «CFX96» .20
Обработка результатов для амплификатора «ДТпрайм» 22

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

Введение

Ген *JAK2* кодирует внутриклеточный белок JAK2, который относится к группе янус-тирозинкиназ и является компонентом сигнального каскада JAK-STAT, играющего важную роль в передаче сигналов от цитокинов [1].

Нарушение регуляции пути JAK-STAT приводит к увеличению пролиферации клеток-предшественниц миелоидного ростка кроветворения и связано с развитием миелопролиферативных заболеваний: истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии, первичного миелофиброза. Активирующая мутация V617F в гене *JAK2* встречается в 96% случаев при истинной полицитемии, в 55% случаев при эссенциальной тромбоцитемии и в 45-68% случаев при первичном миелофиброзе. При истинной полицитемии встречаются также мутации в 12-м экзоне гена *JAK2* [2, 3]. Руксолитиниб, ингибитор JAK2, показан для лечения больных истинной полицитемией, резистентных к терапии гидроксикарбамидом.

Молекулярно-генетическое исследование на наличие мутации V617F в гене *JAK2* рекомендовано при диагностике миелопролиферативных заболеваний и миелодиспластического синдрома [4, 5].

Показания и противопоказания к применению

Показания: сопутствующая диагностика миелопролиферативных заболеваний и миелодиспластического синдрома. Противопоказания: при применении по назначению специально обученным персоналом противопоказания отсутствуют.

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения мутации V617F в гене *JAK2* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Функциональное назначение: сопутствующая диагностика; пациентам с миелодиспластическим синдромом, протекающим с фиброзом стромы, рекомендуется молекулярно-генетическое исследование крови для выявления мутаций в гене *JAK2*, определения прогноза заболевания и выбора тактики терапии.

Материалом для проведения ПЦР является ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной венозной крови. Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

Демографические и популяционные аспекты применения: без ограничений. Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

Требования к квалификации пользователей: только квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики (врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник).

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

2 Характеристика набора

2.1 Варианты исполнения

«Набор реагентов для выявления мутации V617F в гене *JAK2* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-JAK2-V617F" по ТУ 21.20.23-009-57201404-2021» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в двух вариантах исполнения:

1) Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-JAK2-V617F (12)";
2) Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-JAK2-V617F (36)".

2.2 Комплектность

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт качества.

2.3 Состав набора реагентов

Таблица 1. Состав набора реагентов

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объём реагента	
			на 12 реакции	на 36 реакций
1	Жёлтый	ПЦР-смесь JAK2 V617F	250 мкл	750 мкл
2	Синий	Taq ДНК-полимераза	20 мкл	30 мкл
3	Красный	ПКО	70 мкл	200 мкл
4	Белый	ОКО	70 мкл	200 мкл

ПЦР-смесь JAK2 V617F – готовая к применению ПЦР-смесь без Taq ДНК-полимеразы для амплификации фрагмента гена *JAK2* с мутацией V617F. ПЦР-смесь содержит буфер для ПЦР, деионизированную воду, синтетические олигонуклеотиды и флуоресцентные зонды.

Taq ДНК-полимераза – высокоочищенный рекомбинантный фермент Taq ДНК-полимераза.

ПКО – положительный контрольный образец, содержащий ДНК с фрагментом гена *JAK2* с мутацией V617F и ДНК человека без мутаций гена *JAK2*.

ОКО – отрицательный контрольный образец, содержащий воду без нуклеаз.

Набор реагентов не содержит материалов человеческого или животного происхождения, которые можно считать потенциально заражёнными, а также не содержит опасных химических веществ.

Компоненты набора в рабочих концентрациях не токсичны, не обладают канцерогенным и мутагенным действием.

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

2.4 Число анализируемых проб

Набор реагентов на 12 реакции "Real-time-PCR-JAK2-V617F (12)" содержит реактивы для проведения 12 реакций, что позволяет проанализировать в одной постановке четыре клинических образца, положительный и отрицательный контроль (все образцы в дублях).

Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-JAK2-V617F (36)" содержит реактивы для проведения 36 реакций, что позволяет проанализировать 12 клинических образцов в трёх постановках по четыре клинических образца с положительным и отрицательным контролем (все образцы в дублях) или 16 клинических образцов с положительным и отрицательным контролем в одной постановке (все образцы в дублях).

2.5 Принцип действия набора

Принцип действия набора реагентов основан на методе аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с детекцией сигнала с помощью TaqMan зондов.

В состав набора входит смесь для ПЦР, которая содержит все необходимые реагенты за исключением Taq ДНК полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке.

ПЦР-смесь JAK2 V617F содержит реагенты для контрольной реакции и аллель-специфичной реакции. Мишенью для контрольной реакции является константный участок ДНК гена *JAK2*. Продукты этой реакции детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором HEX. В аллель-специфичной реакции происходит избирательная амплификация фрагмента ДНК гена *JAK2*, содержащего мутацию V617F, за счёт использования праймера, который комплементарен последовательности ДНК с этой мутацией. Продукты этой реакции детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM.

Для контроля качества набора в его состав входят положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО). ПКО содержит ДНК с фрагментом гена *JAK2* с мутацией V617F и ДНК человека без мутаций гена *JAK2*. ОКО содержит воду без нуклеаз. В каждом эксперименте используют ПКО и ОКО. Все исследуемые и контрольные образцы тестируют в дублях.

В аллель-специфичной реакции величина Ct для образцов ДНК, содержащих ген *JAK2* без мутации, на несколько циклов выше, чем величина Ct, для образцов ДНК, содержащих ген *JAK2* с мутацией V617F. Наличие мутации в образце ДНК определяется по разнице между значениями Ct по каналу FAM и по каналу HEX.

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

3 Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 1% ДНК с мутацией V617F гена *JAK2* на фоне ДНК гена *JAK2* без мутаций.

Минимальное количество ДНК, необходимое для проведения анализа, составляет 20 мкл с концентрацией 2 нг/мкл (600 копий гена *JAK2* в 1 мкл).

3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ

Под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов специфически определять наличие мутации V617F в гене *JAK2* на фоне ДНК гена *JAK2* без мутаций, что обеспечивается с помощью специфически подобранных праймеров и зондов, проверенных на контрольных образцах. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации для образцов ДНК, несущих ген *JAK2* без мутации V617F.

Аналитическая специфичность целевых участков гена *JAK2* подтверждена *in silico* с помощью ресурса BLAST (*https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi*).

К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец ДНК, относятся следующие вещества: гемоглобин, общий белок крови, триглицериды, билирубин, присутствующие в образце ДНК в результате неполного удаления в ходе выделения ДНК из крови.

Интерферирующие вещества не влияют на результаты анализа в следующих концентрациях: альбумин – 51 мг/мл, билирубин – 35,1 мкмоль/л, гемоглобин – 5 мг/мл, триглицериды – 34,23 ммоль/л.

3.3 Характеристики аналитической эффективности

Повторяемость оценивали в условиях, при которых независимые результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, одним оператором, в пределах короткого промежутка времени. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутации V617F гена *JAK2*. Значение повторяемости результатов при определении мутации V617F гена *JAK2* составило 100% (интервал 90,26-100% с доверительной вероятностью 95%).

Воспроизводимость оценивали в условиях, при которых результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, двумя операторами, с использованием различного оборудования, в разные дни. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутации V617F гена

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

JAK2. Значение воспроизводимости результатов при определении при определении мутации V617F гена *JAK2* составило 100% (интервал 90,26-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.4 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении мутации V617F гена *JAK2* в клинических испытаниях на выборке из 70 образцов составила 100% (интервал 88,43-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.5 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении мутации V617F гена *JAK2* в клинических испытаниях на выборке из 70 образцов составила 100% (интервал 91,19-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.6 Ограничения при применении

Пригодность ДНК для анализа на наличие мутаций гена *JAK2* оценивается в ПЦР по значению Ct по каналу HEX. Если значение Ct образца по каналу HEX превышает допустимые значения, то концентрация ДНК не достаточна, и результаты анализа не валидны. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа

Референтный метод анализа на наличие мутаций гена *JAK2* – секвенирование по Сэнгеру. Референтные материалы отсутствуют. Набор сравнения: «Набор реагентов для проведения ПЦР в реальном времени для количественного выявления мутации V617F в 14 экзоне гена *JAK2* киназы (Jak2V617F-тест) по ТУ 9398-003-58167147-2012» (ООО «ГеноТехнология», Россия).

4 Риски, связанные с применением набора реагентов

Перечень опасных ситуаций, которые относятся к категории R2 «допустимый риск», зависят от человеческого фактора и не могут быть уменьшены производителем другим способом, кроме как добавлением соответствующей информации в инструкцию по применению.

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

1. Деградация компонентов ПЦР-смеси или ПКО, инактивация фермента Taq ДНК-полимеразы из-за нарушения условий хранения и транспортировки или при использовании набора реагентов после истечения срока годности (возможный вред: отсутствие результата).
2. Образец ДНК не добавлен в ПЦР-смесь из-за ошибки при постановке ПЦР, в случае, когда персонал анализирует образцы ДНК без дублей (возможный вред: отсутствие результата).
3. Интерпретация не валидных результатов ПЦР в случае, когда персонал не использует контрольные образцы при постановке ПЦР или не учитывает критерии достоверности (возможный вред: ложноотрицательный результат, ложноположительный результат).
4. Смещение сигналов флуоресценции из-за использования неверного значения для порогового уровня флуоресценции при анализе данных ПЦР (возможный вред: ложноотрицательный результат).

Совокупный остаточный риск является допустимым.

Противопоказания отсутствуют. Ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты, связанные с применением медицинского изделия по назначению, отсутствуют.

5 Меры предосторожности

1. Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2б согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.
2. Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.
3. Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
4. Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
5. Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
6. При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
7. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

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

8. При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.
9. Использовать только ПЦР-смесь и Taq ДНК-полимеразу, входящие в состав набора реагентов.
10. Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
11. Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
12. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
13. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно следует подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами СанПиН 3.3686-21.
14. Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
15. Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

6 Оборудование и материалы

6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Амплификатор планшетного типа с детекцией флуоресценции в режиме реального времени:

Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 в следующих модификациях: 4М1, 4М3, 4М6, 5М1, 5М3, 5М6, 6М1, 6М3, 6М6, 4Х1, 5Х1, 6Х1 (РУ № ФСР 2011/10229, ООО «НПО ДНК-Технология») или термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, исполнения: «С1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (РУ №ФСЗ 2008/01792, «Био-Рад Лабораториез, Инк.», США).

Бокс для ПЦР, например, бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.» по ТУ

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

9443-004-51495026-2004 (РУ № ФСР 2010/07114, ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

Вортекс, например, вортекс персональный V-1 plus (РУ № ФСЗ 2011/09797, ООО «Биосан», Латвия).

Дозаторы переменного объема, например, дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Блэк» по ТУ 9443-008-33189998-2009 (РУ № ФСР 2009/05681, АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия).

Компьютер с операционной системой Windows XP Professional SP3 или Windows 7 и выше, жёстким диском не менее 10 ГБ, тактовой частотой процессора не менее 2.0 ГГц, оперативной памятью не менее 1 ГБ, разрешением экрана не менее 1024*768, программным обеспечением Microsoft Office Excel версии 2003 или выше.

Термостат твердотельный, например, термостат типа «Драй-блок» TDB-120, зариант исполнения: I. Термостат TDB-120 с крышкой и термоблоком А-53 (РУ № РЗН 2018/7729, ООО «Биосан», Латвия).

Холодильник бытовой с холодильной (от 2°С до 8°С) и морозильной камерами (от минус 18°С до минус 25°С) (например, ATLANT XM-6023-031 «ATLANT», Белоруссия).

Центрифуга, например, центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000 с принадлежностями: ротор R-2, ротор R-6, ротор R-12/10, ротор R-12/15 (РУ № ФСЗ 2008/01792, ООО «Биосан», Латвия).

6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

Контейнер для сброса отходов («КМ-ПРОЕКТ», Россия).

Набор реагентов для предварительной обработки цельной крови, например, «Реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови «ГЕМОЛИТИК» по ТУ 9398-097-01897593-2010» (РУ № ФСР 2010/09505, «ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия) или «Набор реагентов для предварительной обработки цельной периферической крови "РеалБест Гемолитик" по ТУ 9398-492-23548172-2013» (РУ № РЗН 2015/2861, АО «Вектор Бест», Россия).

Набор реагентов для выделения ДНК из крови, зарегистрированный в РФ, например, «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала "РИБО-преп" по ТУ 9398-071-01897593-2008», (РУ № ФСР 2008/03147, «ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия).

Наконечники универсальные, например, наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и

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

роботизированных систем. 3. Наконечники универсальные для дозаторов с фильтром объёмом от 0,1 мкл до 1000 мкл (РУ № ФСЗ 2012/12077, «Эксиджен, Инк.», США).

Перчатки медицинские, например, перчатки медицинские диагностические (смотровые) и хирургические одноразовые "Benovy" стерильные и нестерильные. Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные смотровые, цвета: бирюзовый, синий, белый, голубой, сиреневый, зеленый, размеры: XS, S, M, L, XL (вид 185830) (РУ № ФСЗ 2012/12488, «ТГ Медикал Сдн. Бхд.», Малайзия).

Пробирки, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro. 13. Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом от 0,6 мл до 2,0 мл или 17. плашки для ПЦР на 96 лунок («РУ № ФСЗ 2012/11892, Эксиджен, Инк.», США).

Штатив, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro. Вариант исполнения 23. Штатив для пробирок, 80 ячеек (РУ № ФСЗ 2009/05024, «Эксиджен, Инк.», США).

7 Анализируемые пробы

В качестве материала для проведения ПЦР используют клинические образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов цельной венозной крови.

Для выделения ДНК из цельной крови используют зарегистрированные в РФ наборы реагентов. Рекомендуется провести предварительную обработку цельной крови с использованием набора реагентов для селективного лизиса эритроцитов крови, например, «Реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови «ГЕМОЛИТИК» по ТУ 9398-097-01897593-2010» (РУ № ФСР 2010/09505, «ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора») или «Набор реагентов для предварительной обработки цельной периферической крови "РеалБест Гемолитик" по ТУ 9398-492-23548172-2013» (РУ № РЗН 2015/2861, АО «Вектор Бест», Россия). Затем провести экстракцию нуклеиновых кислот с помощью набора «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008» (РУ № ФСР 2008/03147, «ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора»).

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к набору для выделения ДНК.

ВНИМАНИЕ! Образцы крови хранить до момента выделения ДНК при температуре от 2°С до 8°С не более 48 часов. Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

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

8 Подготовка компонентов для анализа

ПЦР-смесь JAK2 V617F, ПКО и ОКО разморозить при комнатной температуре (от 18°С до 25°С) или при 37°С, убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 1-2 сек при 1000 об/мин., чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

ВНИМАНИЕ! После приготовления смесей для ПЦР немедленно поместить оставшиеся реагенты в морозильную камеру с температурой минус 20°С.

ВНИМАНИЕ! Помимо клинических образцов ДНК в каждой постановке необходимо использовать ПКО и ОКО, входящие в состав набора реагентов, все образцы тестировать в дублях.

9 Проведение анализа

9.1 Постановка ПЦР на мутацию V617F гена *JAK2*

9.1.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ОКО и ПКО. Состав реакционной смеси на 1 реакцию приведен в таблице 2, для тестирования N клинических образцов в дублях это количество необходимо умножить на (2N + 5).

Таблица 2. Количество реагентов на одну реакцию

Реагент	Количество
ПЦР-смесь (без полимеразы)	19,8 мкл
Taq ДНК-полимераза	0,2 мкл

9.1.2 ПЦР-смесь JAK2 V617F (пробирка №1, жёлтая крышка), ПКО (пробирка №3, красная крышка) и ОКО (пробирка №4, белая крышка) разморозить при комнатной температуре (от 18°С до 25°С) или при 37°С. Убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и кратко центрифугировать, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

9.1.3 Приготовить реакционную смесь в пробирке объёмом 1,5 мл согласно расчёту (пункт 9.1.1): внести в пробирку расчётное количество ПЦР-смеси JAK2 V617F, добавить Taq ДНК-полимеразу. Перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс) и центрифугировать 5 сек в мини-центрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирки. Реакционная смесь готова.

ВНИМАНИЕ! Использовать немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходной

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

ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы немедленно поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°С.

Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок. ВНИМАНИЕ! Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать стрипы на крышках!

Пример расположения клинических и контрольных образцов при анализе шести образцов ДНК в дублях с использованием стрипов по восемь пробирок приведен на рисунке 1.

Клинические образцы ДНК						**Образцы из набора**	
ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО

Рисунок 1. Схема расположения шести образцов ДНК и контрольных образцов в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок. Указаны, номера образцов ДНК, ОКО и ПКО

9.1.4 Добавить в пробирки по 20 мкл готовой реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой в соответствии со схемой и закрыть крышки.

9.1.5 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

– по 5 мкл клинических образцов ДНК в соответствующие пробирки;

– по 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;

– по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

Каждую пробирку открывать перед добавлением образца и закрывать сразу после добавления.

9.1.6 Закрыть крышки и перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

9.1.7 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

9.1.8 Установить стрипы в блок термоциклера.

9.2 Программирование и запуск термоциклера

9.2.1 Запрограммировать термоциклер для проведения ПЦР и детекции флуоресценции в соответствии с руководством по эксплуатации и п. 9.2.2-9.2.4.

9.2.2 Задать объём реакционной смеси 25 мкл. Запрограммировать протокол проведения ПЦР в соответствии с таблицей 3.

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

Таблица 3. Протокол ПЦР в реальном времени

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	3 мин	Нет
10	Денатурация	95°C	10 сек	
	Отжиг праймеров	61°C	30 сек	
40	Денатурация	95°C	10 сек	
	Отжиг праймеров, элонгация	61°C	30 сек	Да

9.2.3 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

– HEX – регистрация сигнала при амплификации константного участка гена *JAK2*;

– FAM – регистрация сигнала при амплификации фрагмента гена *JAK2* с мутацией V617F.

9.2.4 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

9.2.5 Запустить протокол ПЦР.

10 Анализ результатов

10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

10.1.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для каждого образца определить значение порогового цикла (Ct) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает пороговый уровень (threshold level). Для получения величин Ct использовать логарифмическую шкалу и выставить вручную пороговый ровень 100.

10.1.2 Проверить значения Ct по каналам HEX и FAM последовательно для ОКО, ПКО и клинических образцов ДНК.

10.1.3 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *JAK2* только в том случае, если величины Ct для ОКО и ПКО имеют допустимые значения (таблица 4):

– для ОКО в ПЦР не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и HEX не определяется значение Ct_{FAM}, Ct_{HEX} либо Ct_{FAM}, Ct_{HEX} больше $Ct_{ПКО}$+6 ($Ct_{ПКО}$ – значение Ct ПКО по тому же каналу);

– для ПКО в ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение $Ct_{ПКО}$ меньше или равно значению QC_{FAM} для соответствующего амплификатора;

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

– для ПКО в ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу HEX и определяется значение $Ct_{ПКО}$ меньше или равно значению QC_{HEX} для соответствующего амплификатора;

Таблица 4. Допустимые значения Ct для контрольных образцов

Допустимое значение Ct для образца	
ОКО	**ПКО**
$\mathbf{Ct_{HEX}}$ не определено или $\mathbf{Ct_{HEX}} > Ct_{ПКО}+6$ $\mathbf{Ct_{FAM}}$ не определено или $\mathbf{Ct_{FAM}} > Ct_{ПКО}+6$	$\mathbf{Ct_{HEX}} \leq QC_{HEX}$[1] $\mathbf{Ct_{FAM}} \leq QC_{FAM}$[1]

[1)] Значения QC_{HEX} и QC_{FAM} для каждого амплификатора («CFX96» и «ДТпрайм») указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте качества.

10.1.4 Если величины Ct контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если после повторного анализа значения Ct не соответствуют допустимым пределам, то результаты анализа не валидны. Возможные проблемы представлены в таблице 5.

Таблица 5. Другие значения Ct для контрольных образцов и возможные проблемы

Образец	**Значение Ct**	**Возможные проблемы**
ОКО	$\mathbf{Ct_{HEX}} \leq Ct_{ПКО}+6$ $\mathbf{Ct_{FAM}} \leq Ct_{ПКО}+6$	Возможна контаминация.
ПКО	$\mathbf{Ct_{HEX}} > QC_{HEX}$ $\mathbf{Ct_{FAM}} > QC_{FAM}$	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.

10.2 Оценка пригодности клинических образов ДНК

10.2.1 Сравнить значения Ct по каналу HEX для каждого из клинических образцов ДНК (Ct_{HEX}) со значением Ct ПКО ($Ct_{ПКО}$).

10.2.2 Если значение $Ct_{HEX} \leq Ct_{ПКО}+4$, то концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутации V617F в гене *JAK2*.

10.2.3 Если значение Ct_{HEX} не определено или $Ct_{HEX} > Ct_{ПКО}+4$, то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутации V617F в гене *JAK2*. Необходимо повторить выделение ДНК.

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

10.3 Анализ результатов ПЦР на наличие мутации V617F в гене *JAK2*

10.3.1 Для каждого клинического образца необходимо рассчитать значение $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{HEX}$, где Ct_{FAM} – значение Ct исследуемого образца по каналу FAM, Ct_{HEX} – значение Ct исследуемого образца по каналу HEX. Рекомендации по расчёту ΔCt в программе «MS Office Excel» приведены в приложении А.

10.3.2 Сравнить полученные значения ΔCt клинического образца ДНК со значением точки отсечения (ТО) для мутации V617F ($ТО_{V617F}$). Значение $ТО_{V617F}$ для каждого амплификатора указано на упаковке набора реагентов и в паспорте качества.

10.3.3 Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию V617F в гене *JAK2*), если для обоих дублей значения ΔCt меньше или равны значению $ТО_{V617F}$.

10.3.4 Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию V617F в гене *JAK2* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей значения ΔCt больше $ТО_{V617F}$, или если значения Ct_{FAM} не определены или для одного из дублей значение ΔCt больше $ТО_{V617F}$, а для другого – значение Ct_{FAM} не определено.

10.3.5 Если для одного из дублей значение ΔCt меньше или равно $ТО_{V617F}$, а для другого ΔCt больше $ТО_{V617F}$, то результат считают сомнительным и анализ повторяют.

11 Условия хранения, транспортирования, эксплуатации и утилизации

11.1 Условия хранения

1.1.1 Хранить набор реагентов при температуре от минус 18°С до минус 25°С в течение всего срока годности в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, не допуская проникновения света.

11.1.2 Не подвергать набор реагентов замораживанию и размораживанию более трёх раз, общее время нахождения после оттаивания при температуре 22°С – не более 30 минут.

11.1.3 Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска или 3 месяца после первого вскрытия упаковки набора в зависимости от того, какая дата наступит раньше.

11.2 Условия транспортирования

11.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре не выше минус 18°С.

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

11.2.2 Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы (ХТЛ-4, ООО «Термологика» или аналогичные).

11.2.3 Срок транспортирования – не более 5 суток.

11.2.4 При транспортировании необходимо соблюдать условия, обеспечивающие сохранность набора реагентов от механического повреждения, неблагоприятного воздействия температуры окружающей среды, воздействия солнечного света.

ВНИМАНИЕ! Если реагенты прибыли незамороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «БиоЛинк» (см. раздел 12).

11.3 Условия эксплуатации

11.3.1 Использовать набор реагентов при комнатной температуре (от 18°С до 25°С).

11.3.2 Строго соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

11.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

11.4 Условия утилизации

11.4.1 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПиН 2.1.3684-21.

11.4.2 При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, реагентов и оборудования.

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

12 Гарантийные обязательства

12.1 Гарантии производителя

Производитель гарантирует соответствие качества набора реагентов требованиям нормативной и технической документации при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

12.2 Рекламации

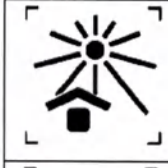
Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действий третьих лиц, либо обстоятельств непреодолимой силы.

Рекламации следует направлять в письменном виде производителю ООО «БиоЛинк».

Адрес:	630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13
Телефон:	+7 (383) 209-32-40
Электронная почта:	info@biolinklab.ru
Веб-сайт:	biolinklab.ru

13 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Не допускать воздействия солнечного света		Дата изготовления (месяц, год)
	Обратитесь к инструкции по применению		Использовать до (месяц, год)
	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Изготовитель

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

Библиография

1. Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins / K. Shuai, A. Ziemiecki, A. F. Wilks, et al. // Nature. – 1993. – Vol. 366. – P. 580-583. – DOI: 10.1038/366580a0
2. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. / A. Pardanani, T. L. Lasho, C. Finke, et al. // Leukemia. – 2007. – Vol. 21. – P. 1960-1963. – DOI: 10.1038/sj.leu.2404810
3. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2V617F mutation status: a prospective study. / P.J. Campbell, L.M. Scott, G. Buck, et al. // Lancet. – 2005. – Vol. 366. – P. 1945-1953. – DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67785-9
4. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии, первичного миелофиброза) (редакция 2020 г.) / А.Л. Меликян, А.М. Ковригина, И.Н. Суборцева и др. // Клиническая онкогематология. – 2021. – Т. 14 (2). – С. 262-298.
5. Клинические рекомендации. Миелодиспластический синдром. / Ассоциация онкологов России. Национальное гематологическое общество. // Год утверждения (частота пересмотра): 2020. – ID: 141– 86 с.

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

Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel»

Обработка результатов для термоциклера «С1000 Touch» с модулем «CFX96»

Экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel». При необходимости выполнить сортировку.

Добавить новые столбцы «Ct FAM» и «Ct HEX». Скопировать значения Ct по каналу FAM в столбце «Cq» (рисунок А1, элемент 2) и вставить в сформированный столбец «Ct FAM» (рисунок А1, элемент 3). Скопировать значения Ct по каналу HEX в столбце «Cq» (рисунок А1, элемент 2) и вставить в сформированный столбец «Ct HEX» (рисунок А1, элемент 4) таким образом, чтобы значения Ct_{FAM} и Ct_{HEX} для каждого образца находились в одной строке, соответствующей этому образцу.

Добавить столбец «ΔCt». Используя функцию вычитания, для каждого образца рассчитать значение $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{HEX}$ (рисунок А1, элемент 5).

Добавить столбец «ТО», внести значение TO_{V617F} для термоциклера «CFX96», указанное на упаковке набора и в паспорте качества (рисунок А1, элемент 6).

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔCt клинических образцов ДНК со значением TO_{V617F} и записать результат (рисунок А1, элемент 7).

Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию V617F в гене *JAK2*), если для обоих дублей значения ΔCt меньше или равны значению TO_{V617F}.

Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию V617F в гене *JAK2* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей значения ΔCt больше TO_{V617F} или если значения Ct_{FAM} не определены или для одного из дублей значение ΔCt больше TO_{V617F}, а для другого – значение Ct_{FAM} не определено.

Если для одного из дублей значение ΔCt меньше или равно TO_{V617F}, а для другого ΔCt больше TO_{V617F}, то результат считают сомнительным, необходимо повторить анализ.

В приведённом на рисунке А1 примере $TO_{V617F} = 10,7$.

Образцы ДНК2 и ДНК3 учитываются как отрицательные, то есть, не содержащие мутацию V617F в гене *JAK2* (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку для образца ДНК2 в одном случае значение Ct_{FAM} не определено (N/A), а в другом случае ΔCt равно 16,1 (больше $TO_{V617F} = 10,7$), для образца ДНК3 значения ΔCt составляют 17,1 и 16,0 (больше $TO_{V617F} = 10,7$).

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

Образцы ДНК4 и ДНК5 учитываются как положительные, содержащие мутацию V617F в гене *JAK2*, так как значения ΔCt для образца ДНК 4 составляют 3,4 и 3,3, для образца ДНК5 составляют 2,1 и 2,2, то есть для обоих дублей значения ΔCt меньше значения TO_{V617F} = 10,7.

Fluor	Content	1 Sample	2 Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	3 Ct FAM	4 Ct HEX	5 ΔCt	6 TO	7 Результат
FAM	Unkn-02	ДНК2	N/A	0,0	0,0	N/A	17,9	#ЗНАЧ!	10,7	отрицательный
FAM	Unkn-02	ДНК2	34,8	34,8	0,0	34,8	18,7	16,1	10,7	отрицательный
FAM	Unkn-03	ДНК3	34,2	33,7	0,7	34,2	17,1	17,1	10,7	отрицательный
FAM	Unkn-03	ДНК3	33,2	33,7	0,7	33,2	17,3	16,0	10,7	отрицательный
FAM	Unkn-04	ДНК4	21,2	21,4	0,3	21,2	17,8	3,4	10,7	положительный
FAM	Unkn-04	ДНК4	21,6	21,4	0,3	21,6	18,3	3,3	10,7	положительный
FAM	Unkn-05	ДНК5	19,8	19,9	0,1	19,8	17,7	2,1	10,7	положительный
FAM	Unkn-05	ДНК5	20,0	19,9	0,1	20,0	17,8	2,2	10,7	положительный
FAM	Neg Ctrl-01	ОКО	31,0	31,5	0,6					
FAM	Neg Ctrl-01	ОКО	31,9	31,5	0,6					
FAM	Pos Ctrl-01	ПКО	25,8	26,0	0,2					
FAM	Pos Ctrl-01	ПКО	26,2	26,0	0,2					
HEX	Unkn-02	ДНК2	17,9	18,3	0,4					
HEX	Unkn-02	ДНК2	18,7	18,3	0,4					
HEX	Unkn-03	ДНК3	17,1	17,2	0,1					
HEX	Unkn-03	ДНК3	17,3	17,2	0,1					
HEX	Unkn-04	ДНК4	17,8	18,0	0,3					
HEX	Unkn-04	ДНК4	18,3	18,0	0,3					
HEX	Unkn-04	ДНК5	17,7	17,7	0,1					
HEX	Unkn-05	ДНК5	17,8	17,7	0,1					
HEX	Neg Ctrl-01	ОКО	13,3	13,6	0,5					
HEX	Neg Ctrl-01	ОКО	14,0	13,6	0,5					
HEX	Pos Ctrl-01	ПКО	16,6	16,5	0,2					
HEX	Pos Ctrl-01	ПКО	16,3	16,5	0,2					

Рисунок А1. Обработка данных в программе «MS Office Excel»

. – в столбце «Sample» обозначены номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.

2 – столбец «Cq», откуда скопированы значения Ct по каналу FAM и по каналу HEX.

3– столбец «Ct FAM», в который вставлены значения Ct по каналу FAM из столбца «Cq».

4– столбец «Ct HEX», в который вставлены значения Ct по каналу HEX из столбца «Cq».

5 – вычисление значений ΔCt по формуле $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{HEX}$.

6 – значение TO_{V617F} для термоциклера «CFX96» (указано на упаковке набора и в паспорте качества).

7 – результат анализа на наличие мутации V617F в гене *JAK2*.

Cq Mean – среднее значение Cq для образца,

Cq Std. Dev – среднеквадратическое отклонение значения Cq для образца.

Значения Cq Mean и Cq Std. Dev не используются при расчётах.

N/A – значение не определено, #ЗНАЧ! – ошибка в значении.

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

Обработка результатов для амплификатора «ДТпрайм»

Экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel». При необходимости выполнить сортировку. Столбец «result» (рисунок А2, элемент 4) экспортируется автоматически из программного обеспечения амплификатора «ДТпрайм». Его следует игнорировать при анализе результатов или удалить.

Добавить столбец «ΔCt». Используя функцию вычитания, для каждого образца рассчитать значение $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{HEX}$ (рисунок А2, элемент 5).

Добавить столбец «ТО», внести значение TO_{V617F} для амплификатора «ДТпрайм», указанное на упаковке набора и в паспорте качества (рисунок А2, элемент 6).

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔCt клинических образцов ДНК со значением TO_{V617F} и записать результат (рисунок А2, элемент 7).

Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию V617F в гене *JAK2*), если для обоих дублей значения ΔCt меньше или равны значению TO_{V617F}.

Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию V617F в гене *JAK2* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей значения ΔCt больше TO_{V617F} или если значения Ct_{FAM} не определены или для одного из дублей значение ΔCt больше TO_{V617F}, а для другого – значение Ct_{FAM} не определено.

Если для одного из дублей значение ΔCt меньше или равно TO_{V617F}, а для другого ΔCt больше TO_{V617F}, то результат считают сомнительным, необходимо повторить анализ.

В приведённом на рисунке А2 примере $TO_{V617F} = 11,1$.

Образцы 1 и 2 учитываются как отрицательные, то есть, не содержащие мутацию V617F в гене *JAK2* (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку для образца 1 в одном случае значение Ct_{FAM} не определено, а в другом случае ΔCt равно 16,8 (больше $TO_{V617F} = 11,1$), для образца 2 значения ΔCt составляют 22,09 и 22,96 (больше $TO_{V617F} = 11,1$).

Образцы 3 и 4 учитываются как положительные, содержащие мутацию V617F в гене *JAK2*, так как значения ΔCt для образца 3 составляют 8,5 и 9,4, а для образца 4 составляют 9,1 и 8,9, то есть для обоих дублей значения ΔCt меньше значения $TO_{V617F} = 11,1$.

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

1	2	3	4	5	6	7
id	Fam	Hex	result	ΔCt	TO	Результат
Образец_1		8,7	-	#ЗНАЧ!	11,1	отрицательный
Образец_1	25,9	9,1	+	16,8	11,1	отрицательный
Образец_2	34,2	12,1	+	22,09	11,1	отрицательный
Образец_2	33,2	12,3	+	20,96	11,1	отрицательный
Образец_3	20	11,5	+	8,5	11,1	положительный
Образец_3	20,5	11,1	+	9,4	11,1	положительный
Образец_4	20,8	11,7	+	9,1	11,1	положительный
Образец_4	20,7	11,8	+	8,9	11,1	положительный
K+	20,3	11,8	+			
K+	20,4	11,5	+			
K-			нд			
K-			нд			

Рисунок В2. Обработка данных в программе «MS Office Excel»

1 – в столбце «id» обозначены номера образцов ДНК, ПКО (K+) и ОКО (K-).

2 – столбец «Fam», значения Ct образцов по каналу FAM.

3 – столбец «Hex», значения Ct образцов по каналу HEX.

4 – столбец «result» необходимо игнорировать.

5 – вычисление значений ΔCt по формуле $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{HEX}$.

6 – значение TO_{V617F} для амплификатора «ДТпрайм» (указано на упаковке набора и в паспорте качества).

7 – результат анализа на наличие мутации V617F в гене *JAK2*.

#ЗНАЧ! – ошибка в значении

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

Производитель: ООО «БиоЛинк»

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: (383) 209-32-40

E-mail: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru

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

Прошито, пронумеровано
и скреплено печатью
25 листов
Директор ООО «БИОЛИНК»
_____ / Корниенко А. А. /
«26» 01 2024 г.

Прошито в количестве 25 листов
«29» февраля 2024 года
Директор клинических исследований и
дополнительных сервисов Дирекции
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»

Я. Э. Новикова _____

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