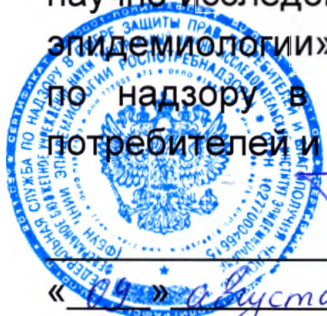


«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного
учреждения науки «Центральный
научно-исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека



В.Г. Акимкин

« 14 » августа 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для качественного определения генотипов
по полиморфизму rs4988235 в гене *MCM6* методом ПЦР

в режиме реального времени

АмплиСенс® LCT-SNP-FL

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	7
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	11
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	12
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	12
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	13
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	14
ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	15
СОСТАВ	15
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	16
А. Подготовка проб для амплификации	16
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	17
В. Анализ и интерпретация результатов	18
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	22
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	23
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	24

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
K+	– положительный контроль ПЦР
K–	– отрицательный контроль ПЦР
МУ	– методические указания
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
СанПиН	– санитарные правила и нормы
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Ct	– cycle threshold (пороговый цикл)
FL	– ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
LCT	– ген лактазы
MCM6	– ген, регулирующий экспрессию гена лактазы LCT
rs	– reference SNP (идентификационный номер полиморфного ДНК-локуса в международных базах данных SNP)
SNP	– single nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)
АмплиСенс® LCT- SNP-FL	– Набор реагентов для качественного определения генотипов по полиморфизму rs4988235 в гене MCM6 методом ПЦР в режиме реального времени АмплиСенс® LCT-SNP-FL

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL предназначен для качественного определения генотипов по полиморфизму 13910 C>T rs4988235 в гене MCM6 в биологическом материале (цельная венозная кровь) человека методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для определения генетической предрасположенности к непереносимости лактозы.

Ограничения применения набора реагентов в различных популяционных и демографических группах отсутствуют.

Потенциальные пользователи медицинского изделия: к работе с набором реагентов допускаются только медицинские

работники (например, врач клинико-диагностической лаборатории, фельдшер-лаборант), обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для определения генетической предрасположенности к непереносимости лактозы.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на амплификации участка геномной ДНК человека, содержащего генетический полиморфизм 13910 C>T rs4988235 в гене *MCM6*, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Амплификация участка ДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых ДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

Аллель-специфичные флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды позволяют определять гомо- и гетерозиготное состояние по анализируемым генетическим полиморфизмам.

Определение аллелей полиморфизма осуществляется по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	rs4988235 аллель T	rs4988235 аллель C
Область амплификации	MCM6	MCM6

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяет выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл
Цельная венозная кровь	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1x10 ⁴

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов определяет генотипы по полиморфизму rs4988235 в гене MCM6.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании 200 образцов геномной ДНК человека с известным генотипом, определенным методом секвенирования с использованием пиросеквенатора PyroMark Q24.

При проведении тестирования неспецифических реакций и неправильного определения генотипов по полиморфизму rs4988235 в гене *MCM6* в исследуемых образцах выявлено не было.

Информация об интерферирующих веществах указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных модельных образцов, которые представляли собой стандартные образцы предприятия, содержащие ДНК гомо- и гетерозигот по полиморфизму rs4988235 с концентрацией 1×10^4 копий/мл каждого.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Полимор- физм	Образцы	Повторяемость		Воспроизводимость	
		Количество образцов	Совпадение результатов с ожидаемыми, %	Количество образцов	Совпадение результатов с ожидаемыми, %
rs4988235	Гомозигота ТТ	10	100	40	100
	Гетерозигота ТС	10	100	40	100
	Гомозигота СС	10	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 4

Результаты тестирования набора реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL и референтного метода

Полимор физм	Количество образцов	Генотип	Результаты применения АмплиСенс® LCT-SNP-FL	Результаты применения референтного метода
rs4988235	250	Гомозигота ТТ	24	24
		Гетерозигота ТС	114	114
		Гомозигота СС	112	112

Диагностические характеристики набора реагентов определяли на 250 образцах геномной ДНК человека. В качестве референтного метода был использован набор реагентов для детекции генетических полиморфизмов методом пиросеквенирования с применением системы генетического анализа серии PyroMark «АмплиСенс® Пироскрин» (форма 10) (РУ № ФСР 2012/13246). При проведении тестирования расхождений между двумя методами выявлено не было.

Таблица 5

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс® LCT-SNP-FL**

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95%)	Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95%)
Цельная венозная кровь	100 (85,75 - 100) %	100 (97,32 - 100) %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые, неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку³, биологический

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

ВНИМАНИЕ! 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, оборудования и реагентов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Перечисленные ниже дополнительные материалы и оборудование, относящиеся к категории медицинских изделий и зарегистрированные на территории Российской Федерации или Евразийского экономического союза, не имеют ограничений по совместному использованию с данным набором реагентов, кроме позиций, для которых указаны конкретные примеры.

Взятие исследуемого материала

1. Пробирки вакуумные для взятия, хранения и транспортировки проб крови для лабораторных исследований *in vitro* с ЭДТА в качестве антикоагулянта.
2. Иглы стерильные двусторонние трубчатые к вакуумным пробиркам для взятия венозной крови для лабораторных исследований *in vitro*.

Предварительная подготовка исследуемого материала

3. Реагент «ГЕМОЛИТИК» (РУ № ФСР 2010/09505) для предобработки цельной венозной крови.
4. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
5. Завинчивающиеся крышки к пробиркам.
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл.
7. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.

8. Бокс микробиологической безопасности II класса защиты.
9. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g.
10. Центрифуга-вортекс.
11. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
12. Автоматические дозаторы переменного объема.
13. Холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16°C.
14. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые.
15. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

16. Комплект реагентов для экстракции ДНК – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147).
17. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.
18. Реагент 1-кратный ТЕ-буфер (10 мМ Трис/HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0).

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

19. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.
20. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл, до 1000 мкл.
21. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл, 0,2 мл или 0,1 мл.

22. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс, УФ-бокс) или бокс микробиологической безопасности II класса защиты.
23. Центрифуга-вортекс.
24. Автоматические дозаторы переменного объема.
25. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399)), ДТ-96/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01250, РУ № ФСР 2011/10229)).
26. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
27. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
28. Емкость для сброса наконечников.
29. ПО для запуска амплификации и автоматической обработки результатов AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) версии 1.0.0 или выше.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служит цельная венозная кровь.

Для получения образцов цельной венозной крови взятие крови провести одноразовой иглой диаметром 0,8-1,1 мм в пробирку (специальную вакуумную систему) с раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта. После взятия крови пробирку несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется, и экстракция ДНК станет невозможной!). После перемешивания пробирку поместить в штатив.

Допускается хранение образцов цельной венозной крови до проведения предобработки:

- при температуре от 20 до 25°С – в течение 6 часов с момента получения материала;
- при температуре от 2 до 8°С – не более 1 суток.

Недопустимо замораживание образцов цельной венозной крови!

Допускается транспортирование цельной венозной крови при температуре от 2 до 8 °С не более 1 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы цельной венозной крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» требуют предварительной подготовки с использованием реагента «ГЕМОЛИТИК»:

В пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл внести 1 мл гемолитика (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) и 0,1 мл крови. Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10 мин, периодически перемешивая. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 4 тыс. g (например, 8 тыс. об/мин для микроцентрифуги MiniSpin) в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка. После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку гемолитиком. Полученный осадок лейкоцитов должен быть немедленно лизирован (в случае экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» добавить 300 мкл раствора для лизиса и в последующем экстрагировать ДНК в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «РИБО-преп», не добавляя раствор для лизиса повторно) или заморожен.

Замороженный осадок можно хранить в течение 2 недель при температуре от минус 24 до минус 16 °С или до 1 года при температуре не выше минус 68 °С.

При использовании других комплектов реагентов для экстракции ДНК подготовка исследуемого материала к экстракции проводится при необходимости в соответствии с инструкцией к применяемому комплекту реагентов.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Ограничения по использованию проб

Непригодными для исследования являются:

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

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале, используемом для исследования.

Были протестированы образцы цельной венозной крови с известными генотипами без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 6. Каждый образец тестировался в трех повторях. Генотип образцов цельной венозной крови был подтвержден методом пиросеквенирования с применением системы генетического анализа серии PyroMark «АмплиСенс® Пироскрин» (форма 10) (ПУ № ФСР 2012/13246).

Таблица 6

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Эндогенные вещества	Общий билирубин	210 мкмоль/л (верхняя граница нормы – 21 мкмоль/л)	Не обнаружено
	Общий холестерин	78 ммоль/л (верхняя граница нормы – 7,8 ммоль/л)	Не обнаружено
	Триглицериды	37,0 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,7 ммоль/л)	Не обнаружено
	Гемоглобин	250 г/л (верхняя граница нормы – 170 г/л)	Не обнаружено
Экзогенные вещества	Калий ЭДТА ⁴	до 2,0 мг/мл	Не обнаружено
	Литий гепарин ⁴	от 12 МЕ/мл	<u>Обнаружено</u>

⁴ В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калий ЭДТА используют в концентрациях от 1,2 до 2,0 мг/мл, литий гепарин – в концентрациях от 12 до 30 МЕ/мл.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «РИБО-преп». Порядок работы с комплектом реагентов «РИБО-преп» смотрите в инструкции к данному комплекту для экстракции.

Объемы реагентов и образцов:

Исследуемый образец – осадок, полученный после предобработки гемолитиком **100 мкл** цельной венозной крови.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Объем элюции – **50 мкл**.

ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации участка ДНК человека, содержащего генетический полиморфизм rs4988235 в гене *MCM6*, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество пробирок, шт
Часть 1 из 2			
К+ ДНК LCT 1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1
К+ ДНК LCT 2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1
К+ ДНК LCT 3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1
Часть 2 из 2			
ПЦР-смесь-FL LCT	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»).

ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft версия 1 и руководство оператора – на электронном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Перед проведением ПЦР рекомендуется определить концентрацию ДНК в полученных экстрагированных образцах и при необходимости развести выделенную ДНК ТЕ-буфером до оптимальной концентрации 10-30 нг в реакцию (соответствует концентрации выделенной ДНК $3 \times 10^5 - 9 \times 10^5$ копий/мл).

А. Подготовка проб для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL LCT, 5 мкл ПЦР-буфера-С и 0,5 мкл полимеразы (TaqF)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на несколько реакций.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL LCT**. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL LCT, ПЦР-буфером-С и полимеразой (TaqF)**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL LCT, ПЦР-буфера-С и полимеразы (TaqF)**, осадить капли на вортексе.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь хранить не более 2 ч.

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной

реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и разведенных до оптимальных концентраций. В случае хранения ДНК-проб перед использованием пробирки с ними необходимо встряхнуть на вортексе и центрифугировать при 10 тыс g в течение 30 сек.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ПЦР (K1+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K+ ДНК LCT 1**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (K2+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K+ ДНК LCT 2**.
 - в) **положительный контроль ПЦР (K3+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K+ ДНК LCT 3**.
 - г) **отрицательный контроль ПЦР (K-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K-**.
 - д) **отрицательный контроль экстракции (OK)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

2. Запустить программу амплификации:
 - а) либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft.

Примечание – Детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS). Перечень совместимых амплификаторов указан на сайте www.amplisens.ru. Перечень совместимого программного обеспечения, поставляемого с амплификаторами, указан в

руководстве оператора ПО ARTS на сайте www.amplisens.ru.

- б) либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения программы, указанной в табл. 7, согласно инструкции по его применению.

Таблица 7

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов
ротаторного⁵ и планшетного⁶ типа**

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	10 с	—	45
	60	20 с	FAM, JOE	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. Если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50°C – 15 минут) для экономии времени.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Таблица 8

Ген	rs	Канал для флуорофора	
		FAM	JOE
MCM6	rs4988235	аллель Т	аллель С

Анализ и интерпретацию результатов проводят вручную с

⁵ Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research), Rotor-Gene Q (QIAGEN).

⁶ Например, CFX96 (Bio-Rad), ДТ-96/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология»).

помощью ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» или в автоматическом режиме, используя ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft. Порядок работы с ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft описан в руководстве оператора.

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t). Особенности установки пороговой линии для приборов планшетного и роторного типа приведены во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. При использовании ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft значения C_t определяются автоматически.

Принцип интерпретации результатов описан ниже.

Определение генотипа по полиморфизму rs4988235 в гене *MSM6*.

4. Для каждого образца анализируются значения пороговых циклов по каналам для флуорофоров FAM и JOE.
2. Если для исследуемого образца по каналу для флуорофора FAM определено значение C_t , равное или меньше граничного, а по каналу для флуорофора JOE значение C_t отсутствует или разница между значениями C_t по каналам для флуорофоров JOE и FAM (ΔC_t (JOE/FAM)) больше граничной, то образец является гомозиготой ТТ.
3. Если для исследуемого образца по каналу для флуорофора JOE определено значение C_t , равное или меньше граничного, а по каналу для флуорофора FAM значение C_t отсутствует или разница между значениями C_t по каналам для флуорофоров FAM и JOE (ΔC_t (FAM/JOE)) больше граничной, то образец является гомозиготой СС.
4. Если для исследуемого образца по каналам для флуорофоров FAM и JOE определено C_t , равное или меньше граничного, и разница значений C_t по модулю между каналами для флуорофоров FAM и JOE (ΔC_t (FAM/JOE)) меньше граничной, то образец является гетерозиготой ТС.

5. Если для исследуемого образца разница значений C_t по модулю между каналами для флуорофоров FAM и JOE (ΔC_t (FAM/JOE)) превышает граничное значение для гетерозиготы и меньше граничного для гомозиготы, то результат данного образца **невалиден**. Необходимо повторить исследование для данного образца, начиная с этапа экстракции.
6. Если для исследуемого образца значение C_t по обоим каналам больше граничного, то результат анализа данного образца **невалиден**. Необходимо повторить исследование для данного образца, начиная с этапа экстракции.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 9 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 9

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение C_t по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция ДНК	Отсутствует или больше граничного	Отсутствует или больше граничного
К–	ПЦР	Отсутствует или больше граничного	Отсутствует или больше граничного
K1+	ПЦР	<u>Определено</u> не более граничного	Отсутствует или разница между значениями C_t по каналам для флуорофоров JOE и FAM больше граничной
K2+	ПЦР	Отсутствует или разница между значениями C_t по каналам для флуорофоров FAM и JOE больше граничной	<u>Определено</u> не более граничного
K3+	ПЦР	<u>Определено</u> не более граничного	<u>Определено</u> не более граничного

Возможные ошибки

1. Для положительного контроля ПЦР (K1+ и/или K2+ и/или K3+) значение порогового цикла (C_t) не соответствует критериям, указанным в табл. 9. Необходимо повторить амплификацию

и детекцию для всех образцов.

2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °C не более 10 сут. в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 26 °C не более 5 сут.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей, хранящихся при разных температурах:

- часть 1 (К+ ДНК LCT 1, К+ ДНК LCT 2, К+ ДНК LCT 3, К–, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °C;
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL LCT, ПЦР-буфер-С, полимеразы (TaqF)) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °C. ПЦР-смесь-FL LCT хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции АмплиСенс® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения $\langle n \rangle$ тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде



Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель



Осторожно

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 13
тринадцать лист 06

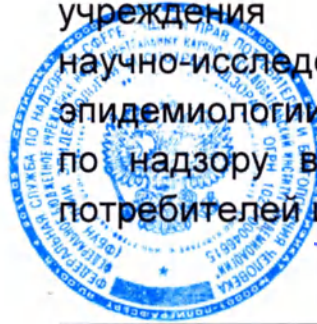
Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



А.О.Лисицына
«09» 08 2024 г.
М.П.

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного
учреждения науки «Центральный
научно-исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека



В.Г. Акимкин

« 09 » августа 2024 г.

РУКОВОДСТВО ОПЕРАТОРА

по применению программного обеспечения

AmpliSens® LCT-SNP Soft

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	4
ПРИНЦИП РАБОТЫ	4
УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ	5
Требования к техническим средствам оператора	5
Требования к входным данным	5
Требования к информационной безопасности	5
ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ	6
Загрузка Amplisens® LCT-SNP Soft в ПО ARTS	6
Формирование и запуск постановки	6
Анализ и интерпретация результатов	7
Авторизация результатов ПЦР-исследования	9
Формирование бланка с результатами	9
СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ	9
ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА И ИНФОРМАЦИЯ О РАЗРАБОТЧИКЕ	11

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем руководстве применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
Детектирующий амплификатор	- прибор для проведения амплификации с детекцией в режиме «реального времени»
ПО	- программное обеспечение, программа
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
Ct	- cycle threshold (пороговый цикл)
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
K-	- отрицательный контроль амплификации
K+	- положительный контроль амплификации
LCT	- ген лактазы
rs	- reference SNP (идентификационный номер полиморфного ДНК-локуса в международных базах данных SNP)
SNP	- single nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Наименование ПО: AmpliSens® LCT-SNP Soft.

Версия ПО: 1 (номера минорных и незначимых изменений не указаны).

Способ размещения и доступа ПО: входит в состав набора реагентов AmpliSens® LCT-SNP-FL. ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft и руководство оператора предоставляются на электронном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Класс безопасности: Класс А в соответствии с п.4.3 ГОСТ IEC 62304.

Порядок нумерации версий ПО: Обозначение версии состоит из трех чисел, разделенных точками, означающих нумерацию мажорных, минорных и незначимых изменений соответственно. Мажорные изменения означают изменение функционального назначения, принципа работы, структуры и функций составных частей ПО; минорные изменения означают изменения названий и обозначений в информационном блоке ПО; незначимые изменения означают изменения (включая исправление ошибок) и доработки, не изменяющие функции, описанные для мажорных и минорных изменений.

Примечание – При обозначении версии ПО в составе набора реагентов AmpliSens® LCT-SNP-FL номера минорных и незначимых изменений не указываются. Полная версия ПО, включая номера минорных и незначимых изменений, указана во вкладыше к набору реагентов и интерфейсе ПО.

ПО соответствует требованиям ГОСТ IEC 62304.

НАЗНАЧЕНИЕ

Программное обеспечение AmpliSens® LCT-SNP Soft предназначено для автоматического программирования детектирующего амплификатора, совместимого с ПО AmpliSens® RealTime Soft (далее – ПО ARTS)¹, и автоматической обработки и интерпретации результатов ПЦР-исследования при использовании набора реагентов AmpliSens® LCT-SNP-FL (далее – набор реагентов). ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft представляет собой программу, содержащую критерии анализа кривых флуоресценции и алгоритм интерпретации результатов, а также информацию об анализатах, используемом биологическом материале, реагентах и контрольных образцах, программе амплификации, указанных в инструкции к набору реагентов.

ПРИНЦИП РАБОТЫ

Для работы ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft необходимо ПО ARTS.

В соответствии с информацией об используемом биологическом материале, реагентах, контрольных образцах и программе амплификации, указанной в ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft, ПО ARTS осуществляет запуск детектирующих амплификаторов. После завершения амплификации ПО ARTS визуализирует полученные флуоресцентные кривые и осуществляет автоматический экспорт полученных данных для контрольных и исследуемых образцов в ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft.

ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft проводит автоматическую интерпретацию результатов с использованием полученных значений пороговых циклов (C_t), включая оценку валидности контрольных образцов и ПЦР-исследования в целом. Полученные в ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft результаты автоматически передаются в ПО ARTS для их визуализации оператору.

Допускается программирование и запуск детектирующего амплификатора без использования ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft и ПО ARTS. В этом случае файл с данными, полученный на детектирующем амплификаторе, можно экспортировать в ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft для дальнейшей автоматической интерпретации результатов.

Технологии искусственного интеллекта в ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft не используются.

¹ Перечень совместимых амплификаторов указан на сайте www.amplisens.ru. Перечень совместимого программного обеспечения, поставляемого с амплификаторами, указан в руководстве оператора ПО ARTS на сайте www.amplisens.ru.

УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ

Требования к техническим средствам оператора

Персональный компьютер с предустановленным ПО ARTS. Системные требования к персональному компьютеру указаны в руководстве оператора ПО ARTS.

Для установки ПО ARTS необходимо обратиться в техническую поддержку для загрузки и запуска установочных файлов ПО ARTS (контакты технической поддержки см. в разделе «Техническая поддержка и информация о разработчике»).

Требования к входным данным

Обозначения ячеек исследуемых и контрольных образцов в интерфейсе ПО ARTS должны строго соответствовать их фактическому расположению в реакционном блоке детектирующего амплификатора.

Требования к информационной безопасности

Влияние угроз и уязвимостей ПО на пользователей или пациентов отсутствует.

ПО не содержит и не обрабатывает персональные данные пациентов.

Средства криптографической защиты в ПО не используются.

Доступ к ПО осуществляется с помощью авторизации пользователя в ПО ARTS (учетная запись). Уровень доступа пользователей должен быть обеспечен исходя из требуемой функциональности.

В рамках инфраструктуры информационных технологий, использующей ПО, необходимо:

- предпринять меры обеспечения информационной безопасности и кибербезопасности для непрерывного функционирования программного обеспечения и исключения возможности несанкционированного доступа к информации в программном обеспечении;
- обеспечить наличие регулярных архивных копий ПО (в т.ч. базы данных) с возможностью их восстановления;
- использовать средства защиты от вредоносных программ;
- соблюдать требования к информационной безопасности, указанные в руководстве оператора ПО ARTS.

ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ

Загрузка AmpliSens® LCT-SNP Soft в ПО ARTS

Загрузка ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft в ПО ARTS при наличии подключения персонального компьютера к сети Интернет производится автоматически при запуске ПО ARTS.

При отсутствии подключения персонального компьютера к сети Интернет загрузка в ПО ARTS производится вручную с электронного носителя путем выбора файла с пакетом ПО, включающим ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft. Для этого в меню **Постановки** выбрать **Пакеты ПО – Загрузить пакет**.

После завершения загрузки установленное ПО отображается в списке **Пакеты ПО** и доступно для формирования и расчета постановок.

Версия ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft отображается в меню **Каталог методик** в столбце **Версия**, а также в меню **Постановки - Пакеты ПО**, после выбора пакета (версия ПО отображается с указанием номеров минорных и незначимых изменений).

Формирование и запуск постановки

Формирование постановки производится с использованием интерфейса ПО ARTS. В соответствии с руководством оператора к ПО ARTS необходимо выполнить следующие действия:

1. Открыть ПО ARTS.
2. Зарегистрировать серию набора реагентов и ввести переменную информацию (при наличии), используя информацию из вкладыша к данной серии набора реагентов.
3. При необходимости сформировать список образцов для исследования с применением набора реагентов (вручную или загрузить из лабораторных информационных систем).
4. Выбрать детектирующий амплификатор и необходимый реакционный блок.
5. Сформировать постановку. Для этого во вкладке, соответствующей выбранному прибору, выбрать **Постановка - Новая постановка**:
 - 5.1. Выбрать из списка доступных программных обеспечений ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft и серию набора реагентов.
 - 5.2. На схематическом изображении реакционного блока, детектирующего амплификатора в используемых ячейках разместить образцы из списка, сформированного в п.3 (или ввести их обозначения вручную), и контрольные образцы.
 - 5.3. Сохранить постановку нажатием кнопки **Сохранить**.

6. Для автоматического запуска амплификации нажать кнопку **Старт**. Ход амплификации отобразится в виде кривых накопления флуоресценции.

Примечание – Допускается программирование и запуск детектирующего амплификатора вручную в соответствии с программой амплификации, указанной в инструкции к набору реагентов.

Анализ и интерпретация результатов

После завершения амплификации ПО ARTS автоматически визуализирует кривые флуоресценции.

Примечание – Если детектирующий амплификатор был запрограммирован и запущен вручную, необходимо сформировать постановку, как описано в разделе «Формирование и запуск постановки», нажать кнопку **Выбрать файл** для указания пути к файлу с детектирующего амплификатора и нажать **Рассчитать**.

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции в ПО ARTS указано в таблице 1.

Таблица 1

Флуорофор	FAM	JOE
Название канала детекции в ПО ARTS	FAM	HEX

В соответствии с критериями анализа кривых флуоресценции, указанными в ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft, автоматически определяется статус каждой кривой по каждому каналу детекции: положительный, отрицательный или сомнительный.

Статус присваивается на основании критериев, оценивающих отклонения формы кривой накопления флуоресценции от нормальной (S-образной) формы, например:

- наличие неспецифических скачков флуоресцентного сигнала;
- низкое соотношение сигнал/шум;
- кинетика накопления флуоресцентного сигнала, отличная от S-образной.

Сомнительные кривые классифицируются на «Сомнительно +» и «Сомнительно –», что следует интерпретировать как:

«Сомнительно +» – наиболее вероятно, что для кривой получен положительный результат, требуется подтверждение.

«Сомнительно –» – наиболее вероятно, что для кривой получен отрицательный результат, требуется подтверждение.

Каждой сомнительной кривой необходимо присвоить статус: «Положительный», «Отрицательный» или сделать заключение о необходимости повторного исследования данного образца. Для этого:

1. Отобразить кривые по всем каналам детекции в режиме отображения «сырых»

данных с прибора (режим «RAW»).

ВНИМАНИЕ! Не следует принимать решение о статусе сомнительной кривой на основании просмотра нормализованных кривых (режим «Norma»), т.к. в данном режиме отображаются флуоресцентные кривые после математической обработки.

2. Отфильтровать кривые со статусом «Сомнительный» по каждому каналу. В скобках рядом с названием канала указано количество сомнительных кривых.
3. В списке образцов последовательно присвоить кривым статус «Положительный», «Отрицательный» или сделать заключение о необходимости повторного исследования данного образца («Перестановка» – образцы будут возвращены в список образцов для возможности повторного исследования).

ВНИМАНИЕ! Присвоение статуса сомнительным кривым производится на основании экспертного мнения сотрудника лаборатории, осуществляющего анализ результатов. В случае если для сомнительной флуоресцентной кривой не удастся принять однозначного решения по ее статусу, рекомендуется провести повторное исследование для данного образца.

После просмотра кривых флуоресценции и присвоения статуса всем сомнительным флуоресцентным кривым необходимо нажать кнопку **Результат** для интерпретации результатов.

Во вкладке **AmpliSens® LCT-SNP Soft** будут выведены результаты, автоматически полученные ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft на основании значений порогового цикла (C_t) для исследуемых образцов, включая оценку валидности контрольных образцов и ПЦР-исследования в целом.

Результаты для контрольных образцов выводятся в виде таблицы с детализацией по каналам детекции. Если для одного или нескольких контрольных образцов получено сообщение об ошибке, данный результат дублируется в строке статуса постановки.

Результаты для исследуемых образцов выводятся в качественном формате в виде таблицы с учетом статуса контролей и указанием канала детекции.

Возможные варианты интерпретации результатов исследуемых образцов указаны в таблице 2.

Таблица 2

Качественное определение
Гомозигота ТТ
Гомозигота СС
Гетерозигота ТС
Невалидный

Если для одного или нескольких контрольных образцов получено сообщение об ошибке, результаты для исследуемых образцов не выводятся.

Авторизация результатов ПЦР-исследования

После вывода результатов для исследуемых образцов во вкладке **AmpliSens® LCT-SNP Soft** необходимо авторизовать (подтвердить) или отвергнуть (отклонить) результаты автоматической интерпретации. Возможны следующие действия в соответствии с руководством оператора к ПО ARTS:

1. Отправка образца на повторное ПЦР-исследование.
2. Отмена результата ПЦР-исследования всех образцов в постановке.
3. Авторизация результата ПЦР-исследования каждого образца.
4. Авторизация результата ПЦР-исследования всех образцов в постановке.
5. Выгрузка результатов ПЦР-исследования в виде файла в формате CSV (в формате электронной таблицы).
6. Выгрузка постановки в отдельный файл для просмотра в ПО ARTS.
7. Закрытие вкладки с результатами ПЦР-исследования. Вкладка **AmpliSens® LCT-SNP Soft** будет закрыта, результаты ПЦР-исследования будут сохранены. Для возвращения к результатам ПЦР-исследования необходимо во вкладке **Список постановок** выбрать из списка необходимую постановку и открыть ее двойным щелчком левой кнопки мыши.

Формирование бланка с результатами

ВНИМАНИЕ! Только авторизованные результаты ПЦР-исследования, полученные с помощью ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft, передаются в ПО ARTS для формирования бланков с результатами для исследуемых образцов и/или передачи в лабораторную информационную систему.

Формирование бланков с результатами производится оператором в ПО ARTS. Поиск, просмотр и печать бланков осуществляется через интерфейс ПО ARTS в соответствии с руководством оператора ПО ARTS.

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ

Сообщение	Причина сообщения	Дальнейшие действия оператора
Для AmpliSens® LCT-SNP Soft не размещен контроль К+ ДНК LCT 1	В реакционном блоке не размещен К+ ДНК LCT 1	Указать положение К+ ДНК LCT 1 в реакционном блоке, используя кнопку К+ ДНК LCT 1

Сообщение	Причина сообщения	Дальнейшие действия оператора
Для AmpliSens® LCT-SNP Soft не размещен контроль К+ ДНК LCT 2	В реакционном блоке не размещен К+ ДНК LCT 2	Указать положение К+ ДНК LCT 2 в реакционном блоке, используя кнопку К+ ДНК LCT 2
Для AmpliSens® LCT-SNP Soft не размещен контроль К+ ДНК LCT 3	В реакционном блоке не размещен К+ ДНК LCT 3	Указать положение К+ ДНК LCT 3 в реакционном блоке, используя кнопку К+ ДНК LCT 3
Для AmpliSens® LCT-SNP Soft не размещен контроль К-	В реакционном блоке не размещен К-	Указать положение К- в реакционном блоке, используя кнопку К-
Для AmpliSens® LCT-SNP Soft не размещен контроль ОК	В реакционном блоке не размещен ОК	Указать положение ОК в реакционном блоке, используя кнопку ОК
Ошибка К+ ДНК LCT 1	Значение C_t для К+ ДНК LCT 1 отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора FAM. Разница между значениями C_t по каналам для флуорофоров FAM и JOE меньше граничной	Необходимо повторить исследование, начиная с этапа амплификации, для всех образцов
Ошибка К+ ДНК LCT 2	Значение C_t для К+ ДНК LCT 2 отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора JOE. Разница между значениями C_t по каналам для флуорофоров JOE и FAM меньше граничной	Необходимо повторить исследование, начиная с этапа амплификации, для всех образцов
Ошибка К+ ДНК LCT 3	Значение C_t для К+ ДНК LCT 3 отсутствует или превышает граничное по каналам для флуорофоров FAM или JOE	Необходимо повторить исследование, начиная с этапа амплификации, для всех образцов
Контаминация К-	Значение C_t для К- превышает граничное по каналам для флуорофоров FAM или JOE	Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов

Сообщение	Причина сообщения	Дальнейшие действия оператора
Контаминация ОКО	Значение C_t для ОК превышает граничное по каналам для флуорофоров FAM или JOE	Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА И ИНФОРМАЦИЯ О РАЗРАБОТЧИКЕ

При выявлении сбоев в работе ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft рекомендуется обращаться в техническую поддержку. При обращении в техническую поддержку необходимо предоставить следующую информацию:

- Номер версии ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft и ПО ARTS.
- Описание ошибки (текст или изображение).
- Описание действия / последовательности действий, при которых возникла ошибка.
- Контакты для обратной связи.

Сотрудники технической поддержки могут запросить дополнительную информацию для решения вопроса.

Телефон: +7 (495) 304 22 06 в рабочие часы организации.

Почта: lab@amplisens.ru в режиме 24x7.

Разработчик ПО: Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Руководство оператора и интерфейс программного обеспечения разработаны на русском языке и могут быть переведены на другие языки без внесения изменений в программный код ПО.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 6
шесть лист об

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



«08» 08 2024 г.

А.О.Лисицына

М.П.



Инструкция по применению набора
реагентов расположена на сайте
www.amplisens.ru



Краткое руководство

набор реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL

Форма 1: **REF** S-4461-1



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642,
e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции: «РИБО-преп».

Контроли: Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

Объем исследуемого образца, контроля и элюции	
При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:	
Исследуемый образец	осадок, полученный после предобработки гемолитиком 100 мкл цельной венозной крови (порядок подготовки исследуемого материала см. в инструкции)
ОКО	100 мкл в пробирку для ОК
Элюция	
все образцы	50 мкл в каждую пробирку

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 3 положительных (K1+, K2+, K3+) и 1 отрицательный (K-) контроли ПЦР, 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL LCT.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL LCT	$10 \cdot (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-С	$5 \cdot (N+K+1)$	
Полимераза (TaqF)	$0,5 \cdot (N+K+1)$	

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь хранить не более 2 ч.

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ПЦР исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов и разведенных до концентрации 10-30 нг в реакцию	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для ОК
K-	в пробирку для K-
K+ ДНК LCT 1	в пробирку для K1+
K+ ДНК LCT 2	в пробирку для K2+
K+ ДНК LCT 3	в пробирку для K3+

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

Запустить программу амплификации:

- либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft, детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS);
- либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения программы, указанной ниже, настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. Если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Цикл	Единая программа амплификации «АмплиСенс»			
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE	

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводить вручную с помощью алгоритма, приведенного в инструкции, или с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналам:

Ген	rs	Канал для флуорофора	
		FAM	JOE
MCM6	rs4988235	аллель Т	аллель С

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны граничные значения порогового цикла (C_т) используемого для проведения анализа и интерпретации результатов.

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2

два лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



М.П.

20 24 г.

А.О.Лисицына

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

**Набор реагентов для качественного определения генотипов по полиморфизму rs4988235
в гене MCM6 методом ПЦР в режиме реального времени
АмплиСенс® LCT-SNP-FL**

Форма 1	LOT 21.07.23	 2023-07-21
		 2024-10-21

ТУ 21.20.23-446-01897593-2022.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Отрицательный результат для образца ОК (отрицательный контроль экстракции)	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
Положительный результат для образца К+ ДНК LCT 1 (положительный контроль ПЦР)	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналу для флуорофора FAM	соответствует
	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора JOE отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров JOE и FAM больше граничного значения	
Положительный результат для образца К+ ДНК LCT 2 (положительный контроль ПЦР)	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналу для флуорофора JOE	соответствует
	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров FAM и JOE больше граничного значения	
Положительный результат для образца К+ ДНК LCT 3 (положительный контроль ПЦР)	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
Определен генотип 4-х тестируемых образцов ДНК человека по полиморфизму rs4988235	Значения <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров FAM и JOE соответствуют одному из вариантов, приведенных во вкладыше к набору реагентов	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
Часть 1 из 2			
К+ ДНК LCT 1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К+ ДНК LCT 2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К+ ДНК LCT 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Часть 2 из 2			
ПЦР-смесь-FL LCT	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8°C не более 10 сут. в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 26°C не более 5 сут.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей, хранящихся при разных температурах:

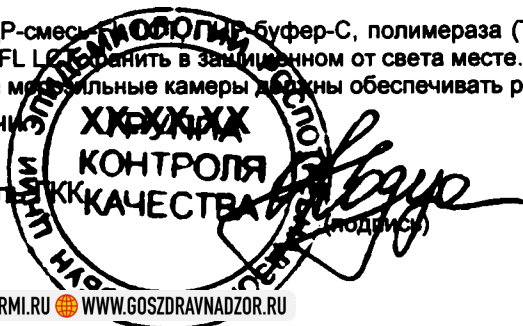
- часть 1 (К+ ДНК LCT 1, К+ ДНК LCT 2, К+ ДНК LCT 3, К-, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8°C;
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL LCT, ПЦР-буфер-С, полимераза (TaqF)) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

ПЦР-смесь-FL LCT хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи:

Руководитель:


 (Коды О.И.)
(Ф.И.О.)

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

**Набор реагентов для качественного определения генотипов по полиморфизму rs4988235
в гене MCM6 методом ПЦР в режиме реального времени
АмплиСенс® LCT-SNP-FL**

Форма 1	LOT A21.07.23	 2023-07-21
		 2024-10-21

ТУ 21.20.23-446-01897593-2022.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Отрицательный результат для образца ОК (отрицательный контроль экстракции)	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
Положительный результат для образца К+ ДНК LCT 1 (положительный контроль ПЦР)	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналу для флуорофора FAM	соответствует
	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора JOE отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров JOE и FAM больше граничного значения	
Положительный результат для образца К+ ДНК LCT 2 (положительный контроль ПЦР)	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналу для флуорофора JOE	соответствует
	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров FAM и JOE больше граничного значения	
Положительный результат для образца К+ ДНК LCT 3 (положительный контроль ПЦР)	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
Определен генотип 4-х тестируемых образцов ДНК человека по полиморфизму rs4988235	Значения <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров FAM и JOE соответствуют одному из вариантов, приведенных во вкладыше к набору реагентов	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
Часть 1 из 2			
К+ ДНК LCT 1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К+ ДНК LCT 2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К+ ДНК LCT 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Часть 2 из 2			
ПЦР-смесь-FL LCT	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8°C не более 10 сут. в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 26°C не более 5 сут.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей, хранящихся при разных температурах:

часть 1 (К+ ДНК LCT 1, К+ ДНК LCT 2, К+ ДНК LCT 3, К-, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8°C;

часть 2 (ПЦР-смесь-FL LCT, ПЦР-буфер-С, полимераза (TaqF)) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С, ПЦР-смесь-FL LCT хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи:

XXXXXX

Руководитель ПК

КОНТРОЛЯ
КАЧЕСТВА

(подпись)

(Коды О.И.)

(Ф.И.О.)

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2

фв лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



06 2024 г.
и.п.

А.О.Лисицына

ВКЛАДЫШ

к набору реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL

Форма 1: REF S-4461-1

LOT 21.07.23

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000/Q

Канал для флуорофора	Calibrate/Gain Optimisation... / Опт.уровня сигн	Dynamic tube/ Динамич.фон	Slope Correct/ Коррект. уклона	More settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	включена	включена	15%
JOE/Yellow	от 5 FI до 10 FI	включена	включена	15%

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96

Примечание – Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5°C/sec**.

ДТ-96/«ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Канал	Критерий положительного результата ПЦР	Величина Threshold	Нижняя граница/ порог положительного результата	Верхняя граница/порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
Ct(Cp)	Пороговый (Ct)	Fam, Hex/R6G	90%	10 StD	5% F(Cp)	30% F(Cp)	Не использовать	Включить

Установка пороговой линии для приборов планшетного и роторного типа

Канал для флуорофора	Threshold/Порог
FAM	Пороговая линия первоначально* устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК LCT 1
JOE	Пороговая линия первоначально* устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК LCT 2

***Внимание!** Если модуль разницы значений пороговых циклов (Ct) между двумя каналами для флуорофоров (FAM и JOE) для К+ ДНК LCT 3 превышает 0,5, пороговые линии корректируются до достижения разницы значений Ct между каналами менее 0,5 по модулю.

Граничные значения порогового цикла Ct для приборов роторного типа

Образец	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
К+ ДНК LCT 1	≤ 29,00	Отсутствует либо $\Delta Ct (JOE/FAM) > 3,5$
К+ ДНК LCT 2	Отсутствует, либо $\Delta Ct (FAM/JOE) > 3,5$	≤ 29,00
К+ ДНК LCT 3	≤ 29,00	≤ 29,00
К-	Отсутствует или > 34	Отсутствует или > 34
ОК	Отсутствует или > 34	Отсутствует или > 34
МСМ6, rs4988235 гомозигота ТТ	≤ 34,00	Отсутствует, либо $\Delta Ct (JOE/FAM) > 3,5$
МСМ6, rs4988235 гетерозигота ТС	≤ 34,00	≤ 34,00
	$ \Delta Ct (FAM/JOE) < 1$	
МСМ6, rs4988235 гомозигота СС	Отсутствует, либо $\Delta Ct (FAM/JOE) > 3,5$	≤ 34,00

Граничные значения порогового цикла C_t для приборов планшетного типа и для ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft

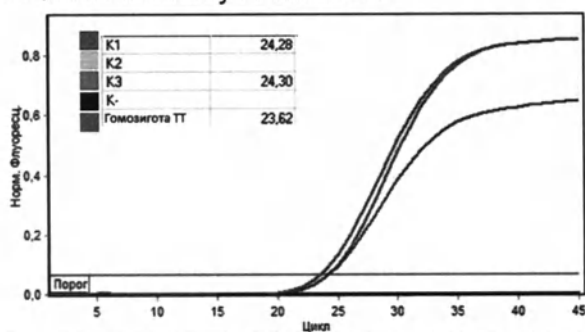
Образец	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
К+ ДНК LCT 1	$\leq 32,00$	Отсутствует либо $\Delta C_t (JOE/FAM) > 3,5$
К+ ДНК LCT 2	Отсутствует, либо $\Delta C_t (FAM/JOE) > 3,5$	$\leq 32,00$
К+ ДНК LCT 3	$\leq 32,00$	$\leq 32,00$
К-	Отсутствует или > 37	Отсутствует или > 37
ОК	Отсутствует или > 37	Отсутствует или > 37
MCM6, rs4988235 гомозигота TT	$\leq 37,00$	Отсутствует, либо $\Delta C_t (JOE/FAM) > 3,5$
MCM6, rs4988235 гетерозигота TC	$\leq 37,00$	$\leq 37,00$
	$ \Delta C_t (FAM/JOE) < 1$	
MCM6, rs4988235 гомозигота CC	Отсутствует, либо $\Delta C_t (FAM/JOE) > 3,5$	$\leq 37,00$

ПРИЛОЖЕНИЕ К ВКЛАДЫШУ по применению набора реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL

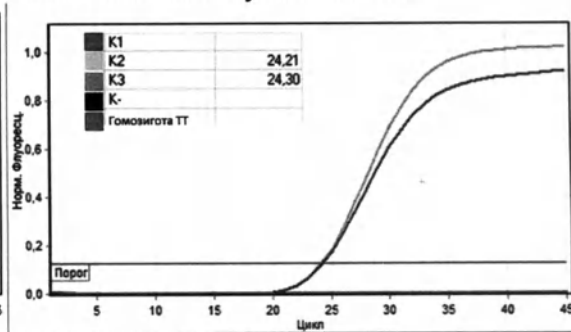
Примеры интерпретации результатов анализа исследуемых образцов, полученных на приборе Rotor-Gene:

Гомозигота TT

Анализ по каналу FAM/Green

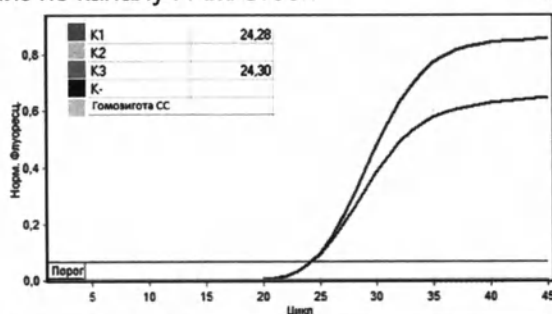


Анализ по каналу JOE/Yellow

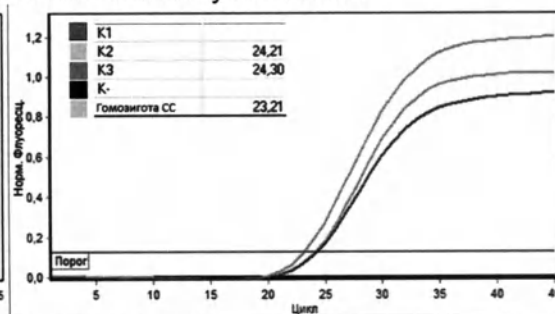


Гомозигота CC

Анализ по каналу FAM/Green

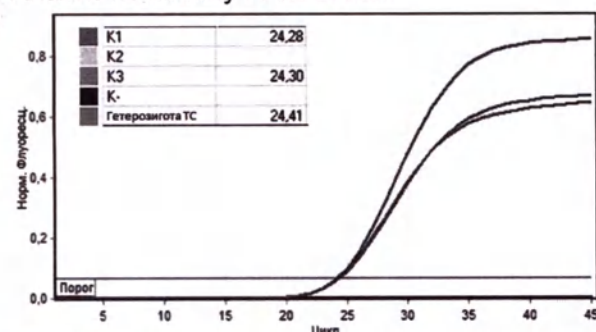


Анализ по каналу JOE/Yellow

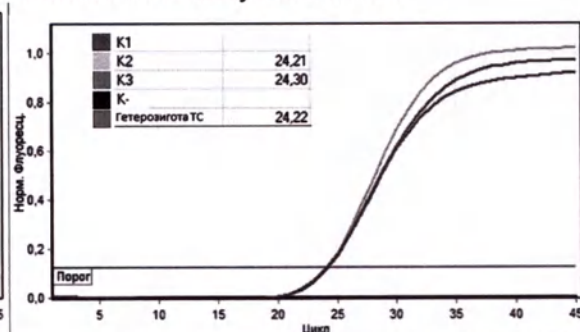


Гетерозигота TC

Анализ по каналу FAM/Green



Анализ по каналу JOE/Yellow



Образец	Значения Ct			Граничные значения для флуорофора		Результаты
	FAM	JOE	ΔCt	FAM	JOE	
К+ ДНК LCT 1	24,28	-	-	≤ 29	Отсутствует, либо $\Delta Ct (JOE/FAM) > 3,5$	Гомозигота TT
К+ ДНК LCT 2	-	24,21	-	Отсутствует, либо $\Delta Ct (FAM/JOE) > 3,5$	≤ 29	Гомозигота CC
К+ ДНК LCT 3	24,3	24,3	$ \Delta Ct (FAM/JOE) $ $ 24,3-24,3 =0$	≤ 29	≤ 29	Гетерозигота TC
К-	-	-	-	Отсутствует или > 34	Отсутствует или > 34	Соответствует
Исследуемый образец	23,62	-	-	≤ 34	Отсутствует, либо $\Delta Ct (JOE/FAM) > 3,5$	Гомозигота TT
	-	23,21	-	Отсутствует, либо $\Delta Ct (FAM/JOE) > 3,5$	≤ 34	Гомозигота CC
	24,41	24,22	$ \Delta Ct (FAM/JOE) $ $0,19$	≤ 34	≤ 34	Гетерозигота TC
				$\Delta Ct (FAM/JOE) < 1$		

ВКЛАДЫШ

к набору реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL

Форма 1: REF S-4461-1

LOT A21.07.23

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000/Q

Канал для флуорофора	Calibrate/Gain Optimisation... / Опт.уровня сигн	Dynamic tube/ Динамич.фон	Slope Correct/ Коррект. уклона	More settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	включена	включена	15%
JOE/Yellow	от 5 FI до 10 FI	включена	включена	15%

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96

Примечание – Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5°C/sec.**

DT-96/«ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Канал	Критерий положительного результата ПЦР	Величина Threshold	Нижняя граница/ порог положительного результата	Верхняя граница/порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
Ct(Cp)	Пороговый (Ct)	Fam, Hex/R6G	90%	10 StD	5% F(Cp)	30% F(Cp)	Не использовать	Включить

Установка пороговой линии для приборов планшетного и роторного типа

Канал для флуорофора	Threshold/Порог
FAM	Пороговая линия первоначально* устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК LCT 1
JOE	Пороговая линия первоначально* устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК LCT 2

***Внимание!** Если модуль разницы значений пороговых циклов (Ct) между двумя каналами для флуорофоров (FAM и JOE) для К+ ДНК LCT 3 превышает 0,5, пороговые линии корректируются до достижения разницы значений Ct между каналами менее 0,5 по модулю.

Граничные значения порогового цикла Ct для приборов роторного типа

Образец	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
К+ ДНК LCT 1	≤ 29,00	Отсутствует либо $\Delta Ct (JOE/FAM) > 3,5$
К+ ДНК LCT 2	Отсутствует, либо $\Delta Ct (FAM/JOE) > 3,5$	≤ 29,00
К+ ДНК LCT 3	≤ 29,00	≤ 29,00
К-	Отсутствует или > 34	Отсутствует или > 34
ОК	Отсутствует или > 34	Отсутствует или > 34
MCM6, rs4988235 гомозигота TT	≤ 34,00	Отсутствует, либо $\Delta Ct (JOE/FAM) > 3,5$
MCM6, rs4988235 гетерозигота TC	≤ 34,00	≤ 34,00
	$ \Delta Ct (FAM/JOE) < 1$	
MCM6, rs4988235 гомозигота CC	Отсутствует, либо $\Delta Ct (FAM/JOE) > 3,5$	≤ 34,00

Граничные значения порогового цикла C_t для приборов планшетного типа и для ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft

Образец	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
К+ ДНК LCT 1	$\leq 32,00$	Отсутствует либо $\Delta C_t (JOE/FAM) > 3,5$
К+ ДНК LCT 2	Отсутствует, либо $\Delta C_t (FAM/JOE) > 3,5$	$\leq 32,00$
К+ ДНК LCT 3	$\leq 32,00$	$\leq 32,00$
К-	Отсутствует или > 37	Отсутствует или > 37
ОК	Отсутствует или > 37	Отсутствует или > 37
MCM6, rs4988235 гомозигота TT	$\leq 37,00$	Отсутствует, либо $\Delta C_t (JOE/FAM) > 3,5$
MCM6, rs4988235 гетерозигота TC	$\leq 37,00$	$\leq 37,00$
	$ \Delta C_t (FAM/JOE) < 1$	
MCM6, rs4988235 гомозигота CC	Отсутствует, либо $\Delta C_t (FAM/JOE) > 3,5$	$\leq 37,00$

ПРИЛОЖЕНИЕ
Пример
Гомозиготы
АА

Нормативные
документы

Гомозиготы
АА

Гетерозиготы
АА

К

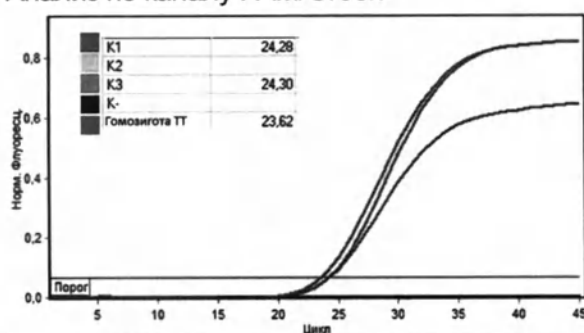
К

К

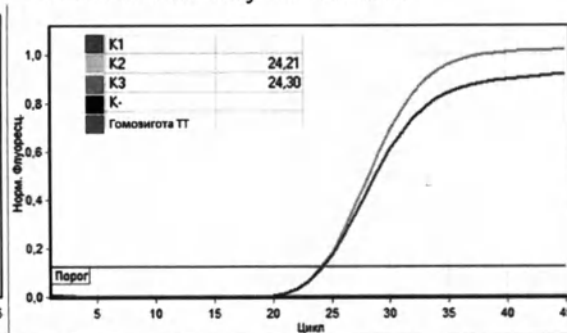
ПРИЛОЖЕНИЕ К ВКЛАДЫШУ по применению набора реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL
Примеры интерпретации результатов анализа исследуемых образцов, полученных на приборе Rotor-Gene:

Гомозигота ТТ

Анализ по каналу FAM/Green

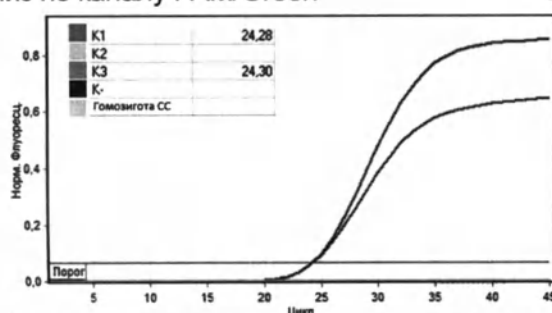


Анализ по каналу JOE/Yellow

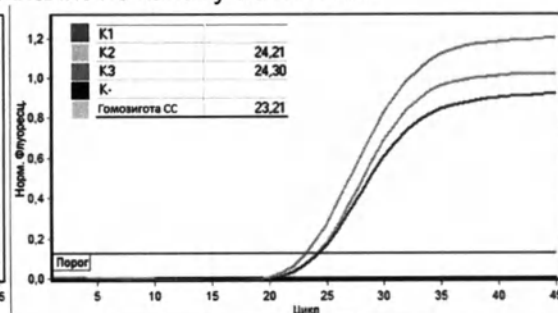


Гомозигота СС

Анализ по каналу FAM/Green

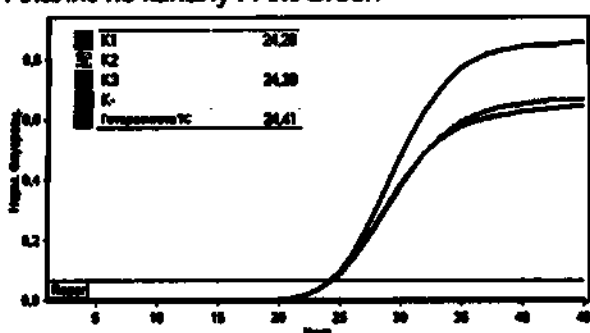


Анализ по каналу JOE/Yellow

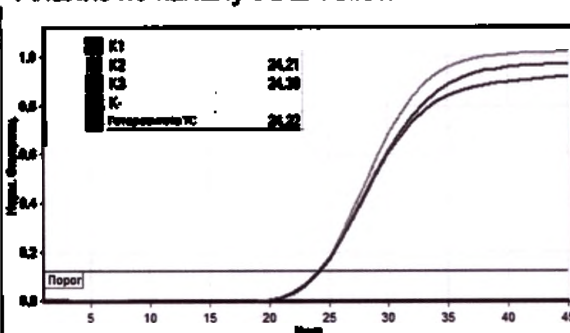


Гетерозигота ТС

Анализ по каналу FAM/Green



Анализ по каналу JOE/Yellow



Образец	Значения Ct			Граничные значения для флуорофора		Результаты
	FAM	JOE	ΔCt	FAM	JOE	
К+ ДНК LCT 1	24,28	-	-	≤ 29	Отсутствует, либо $\Delta Ct (JOE/FAM) > 3,5$	Гомозигота ТТ
К+ ДНК LCT 2	-	24,21	-	Отсутствует, либо $\Delta Ct (FAM/JOE) > 3,5$	≤ 29	Гомозигота СС
К+ ДНК LCT 3	24,3	24,3	$ \Delta Ct (FAM/JOE) = 24,3-24,3 = 0$	≤ 29	≤ 29	Гетерозигота ТС
К-	-	-	-	Отсутствует или > 34	Отсутствует или > 34	Соответствует
Исследуемый образец	23,62	-	-	≤ 34	Отсутствует, либо $\Delta Ct (JOE/FAM) > 3,5$	Гомозигота ТТ
	-	23,21	-	Отсутствует, либо $\Delta Ct (FAM/JOE) > 3,5$	≤ 34	Гомозигота СС
	24,41	24,22	$ \Delta Ct (FAM/JOE) = 0,19$	≤ 34	≤ 34	Гетерозигота ТС
				$\Delta Ct (FAM/JOE) < 1$		

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL

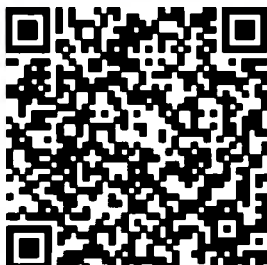
Форма 1
REF S-4461-1

LOT 21.07.23
2024-10-21

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов
автоматизированным способом

ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft в. 1.0.0

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL

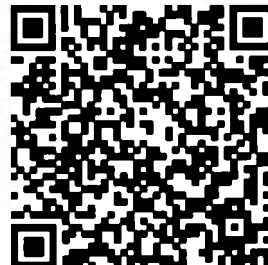
Форма 1
REF S-4461-1

LOT 21.07.23
2024-10-21

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов
автоматизированным способом

ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft в. 1.0.0

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL

Форма 1
REF S-4461-1

LOT 21.07.23
2024-10-21

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов
автоматизированным способом

ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft в. 1.0.0

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL

Форма 1
REF S-4461-1

LOT 21.07.23
2024-10-21

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов
автоматизированным способом

ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft в. 1.0.0

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



ВКЛАДЫШ

к набору реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL

Форма 1

S-4461-1

LOT



A21.07.23

2024-10-21

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов автоматизированным способом

ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft в. 1.0.0

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



ВКЛАДЫШ

к набору реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL

Форма 1

REF

S-4461-1

LOT



A21.07.23

2024-10-21

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов автоматизированным способом

ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft в. 1.0.0

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



ВКЛАДЫШ

к набору реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL

Форма 1

REF

S-4461-1

LOT



A21.07.23

2024-10-21

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов автоматизированным способом

ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft в. 1.0.0

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



ВКЛАДЫШ

к набору реагентов АмплиСенс® LCT-SNP-FL

Форма 1

REF

S-4461-1

LOT



A21.07.23

2024-10-21

Информация для запуска амплификации, анализа и интерпретации результатов автоматизированным способом

ПО AmpliSens® LCT-SNP Soft в. 1.0.0

QR-код для автоматического ввода информации в ПО



КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 6
шесть лист об

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



А.О.Лисицына

2024 г.