

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2024 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления аллеля HLA-B*5701 человека
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
«РеалБест-Генетика HLA-B*5701»

ВВЕДЕНИЕ

Наличие аллеля HLA-B*5701 в генотипе пациента ассоциировано с развитием сильных нежелательных побочных реакций при приёме абакавира. Абакавир (ABC) - нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (НИОТ), используемый для терапии ВИЧ-инфекции. Препарат часто включают в состав комбинированной терапии, благодаря гибкости его дозирования и схемы приёма, а также возможности сочетания с другими классами препаратов в одной таблетке. Согласно клиническим рекомендациям в Российской Федерации (РФ) абакавир входит в состав нескольких альтернативных схем антиретровирусной терапии первого ряда. Абакавир переносится хорошо большинством пациентов, побочные эффекты ограничиваются тошнотой, диареей и головной болью. Однако, примерно у 5-8% пациентов развивается реакция гиперчувствительности в течение первых 6 недель приёма препарата абакавир. Гиперчувствительность проявляется как минимум двумя из следующих симптомов: лихорадка, сыпь, кашель, симптомы со стороны ЖКТ, одышка, утомляемость. Тяжесть симптомов нарастает по мере продолжения приёма абакавира и значительно снижается в течение первых же суток после отмены препарата, а повторное назначение абакавир-содержащих лекарств у таких людей может привести к возвращению всех побочных эффектов и аллергической реакции, угрожающей жизни. Реакция гиперчувствительности строго связана с присутствием аллеля HLA-B*5701, и анализ на его наличие перед назначением абакавира рекомендован Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA), Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA), Консорциумом по внедрению клинической фармакогенетики (CPIC) и

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: Директором
по производству Тихоновым Р.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

некоторыми другими международными ассоциациями, а также клиническими рекомендациями РФ. Внедрение тестирования на наличие HLA-B*5701 до начала лечения абакавиром является одним из лучших примеров применения фармакогенетических исследований в клинической практике. Отрицательная предсказательная ценность анализа составляет 100%, положительная предсказательная ценность - около 50%. По исследованиям, проведенным в Великобритании и США, тестирование на наличие HLA-B*5701 перед лечением экономически выгодно, так как позволяет избежать затрат на ведение пациентов с гиперчувствительностью и необоснованной замены абакавира на более дорогие препараты у пациентов с отсутствием гиперчувствительности.

Список литературы:

Клинические рекомендации «ВИЧ-инфекция у взрослых», КР79, 2020.

Barbarino J.M., Kroetz D.L., Altman R.B., and Klein T.E. PharmGKB summary: abacavir pathway. // Pharmacogenetics and genomics, 2014, V. 24, N. 5, P. 276-82.

Hetherington S., Hughes A.R., Mosteller M. et al. Genetic variations in HLA-B region and hypersensitivity reactions to abacavir // Lancet, 2002, V. 359, P. 1121-2.

Hughes D.A., Vilar F.J., Ward C.C., Alfirevic A., Park B.K., Pirmohamed M. Cost-effectiveness analysis of HLA-B*5701 genotyping in preventing abacavir hypersensitivity // Pharmacogenetics, 2004, V. 14, P. 335-42.

Hughes C.A., Foisy M.M., Dewhurst N. et al. Abacavir Hypersensitivity Reaction: an Update // The Annals of Pharmacotherapy, 2008, V. 42, P. 387-96.

Mallal S., Phillips E., Carosi G. et al. HLA-B*5701 Screening for Hypersensitivity to Abacavir // N Engl J Med, 2008, V.358, P. 568-79.

Martin M.A., Klein T.E., Dong B.J., Pirmohamed M., Haas D.W., Kroetz D.L., Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium in Clinical pharmacology and therapeutics (2012)

Martin M.A. and Kroetz D.L. Abacavir Pharmacogenetics – From Initial Reports to Standard of Care // Pharmacotherapy, 2013, V. 33, N. 7, P. 765–75.

Saag M., Balu R., Phillips E., Brachman P. et al. High sensitivity of human leukocyte antigen-b*5701 as a marker for immunologically confirmed abacavir hypersensitivity in white and black patients // Clin Infect Dis, 2008, V. 46, N. 7, P. 1111-8.

Zucman D., Truchis Pd., Majerholc C., Stegman S., Caillat-Zucman S. Prospective screening for human leukocyte antigen-B*5701 avoids abacavir hypersensitivity reaction in the ethnically mixed French HIV population // J Acquir Immune Defic Syndr, 2007, V. 45, N. 1, P. 1-3.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления аллеля HLA-B*5701 человека методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест-Генетика HLA-B*5701» предназначен

для качественного выявления аллеля *5701 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA-B*5701), ассоциированного с реакцией гиперчувствительности на абакавир, в образцах геномной ДНК человека, выделенной из цельной крови (с ЭДТА), методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. Набор может быть применен при подборе схемы антиретровирусной терапии при ВИЧ-инфекции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранных фрагментов ДНК человека – одного, специфичного для аллеля HLA-B*5701, и другого, соответствующего аутосомному гену HMBS, общему для всех образцов ДНК человека.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка ДНК человека гибридационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством специфичной ДНК в образце.

Амплификация участка гена HMBS должна детектироваться в каждом образце, что служит контролем присутствия в смеси достаточного количества ДНК человека и контролем правильности проведенных процедур пробоподготовки. Амплификация участка гена HLA-B детектируется в случае присутствия в генотипе данного индивида аллеля HLA-B*5701. Ввиду значительной гомологии между нуклеотидными последовательностями разных аллелей локуса HLA-B и HLA-C возможна фиксация нарастания флуоресценции в пробирке при отсутствии целевого аллеля HLA-B*5701 в случае неполной комплементарности праймеров. Заключение о наличии аллеля HLA-B*5701 делается не по факту наличия роста флуоресценции в

соответствующем канале, а с учётом значений пороговых циклов для специфичного для HLA-B*5701 маркера и контрольного маркера присутствия ДНК человека.

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) <i>Описание.</i>	Количество
Контрольный образец (КО) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	1 пробирка, 1 мл
Отрицательный контрольный образец (ОКО) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	1 пробирка, 1 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) <i>Лиофилизированная</i>	48 пробирок
Элюирующий раствор «Генетика 2» <i>Бесцветная жидкость</i>	2 фл., по 12 мл
Оптическая пленка	1 лист
Вкладыш со штрих-кодом	1 шт.

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- инструкция по применению и паспорт (количество копий определяется в договоре на поставку продукции).

Инструкция по применению и паспорт размещены на сайте <http://www.vector-best.ru>.

2.3. Условия применения.

Аналитические и диагностические характеристики набора были валидированы при выделении ДНК из клинического материала (цельной крови с ЭДТА) с использованием наборов: «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» (АО «Вектор-Бест, Россия, РУ № РЗН 2015/2947), «РеалБест ГенМаг» (АО «Вектор-Бест, Россия, РУ № РЗН 2021/13841) и «РеалБест экстракция 100» (АО «Вектор-Бест», Россия, РУ РЗН 2014/1423), позволяющих получить концентрацию ДНК человека не менее 1000 копий на реакционную пробирку (на 50 мкл препарата выделенной ДНК).

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированными в установленном порядке в РФ и соответствующими следующим требованиям:

- термоблок для пробирок объемом 0,2 мл;
- каналы детекции: «FAM», «ROX»;
- подогреваемая крышка с температурой более 100 °С;
- средняя скорость нагрева не менее 2,0 °С /сек;
- средняя скорость охлаждения не менее 1,0 °С/сек;
- точность поддержания температуры не более $\pm 0,3$ °С;
- однородность температуры не более $\pm 0,6$ °С.

Валидированы следующие амплификаторы: «CFX96» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США, РУ № ФСЗ 2008/03399), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229), «FLUORITE» (Xi'an TianLong, Science and Technology Co., Ltd., Китай, РУ № РЗН 2022/16415).

По вопросам применения амплификаторов, не указанных выше, требуется согласование с производителем набора реагентов.

Запуск программы амплификации и анализ результатов может производиться с помощью программного обеспечения «GP.РеалБест Диагностика» (размещено на сайте <http://www.vector-best.ru>).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

Показания к применению.

Набор может быть использован при подборе схемы антиретровирусной терапии при ВИЧ-инфекции.

Противопоказаний к применению медицинского изделия нет (не применимо).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления аллеля HLA-B*5701 контролируется по стандартному образцу предприятия, содержащему отрицательные и положительные по HLA-B*5701 образцы.

3.2. Аналитическая чувствительность.

Аналитическая чувствительность выявления ДНК HLA-B*5701 – минимальное количество ДНК человека, достаточное для получения положительного валидного результата анализа, 1000 копий в 50 мкл препарата выделенной ДНК (соответствует $2,8 \times 10^5$ копий/мл цельной крови при использовании для выделения ДНК набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс», $1,8 \times 10^5$ копий/мл цельной крови при использовании набора «РеалБест экстракция 100» и $9,0 \times 10^4$ копий/мл цельной крови при использовании набора «РеалБест ГенМаг»). Контролируется по образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия, с содержанием ДНК человека (ген HMBS) 1000 копий в 50 мкл препарата выделенной ДНК. В 100 % случаев должен быть получен положительный валидный результат.

3.3. Аналитическая специфичность.

Был проведен *in silico* анализ последовательностей праймеров и зондов по базе нуклеотидных последовательностей ДНК человека и по базам последовательностей вирусов и микроорганизмов, в том числе микроорганизмов, которые могут присутствовать в ротовой полости или в цельной крови. Перекрестно реагирующих нецелевых участков генома человека и вирусов или микроорганизмов обнаружено не было. По локусу HLA-B при анализе базы ва-

риантов HLA (IPD-IMGT/HLA Database, <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>) выявлены несколько редко встречающихся аллелей (*35:208, *35:317, *37:94, *55:14, *57:06, *57:08, *57:10, *57:13-*57:16 и некоторых других вариантов из группы В*57), которые полностью совпадают с вариантом HLA-B*57:01 по детектируемому в ПЦР участку гена. Дифференциальное выявление этих аллелей отдельно от HLA-B*57:01 возможно только при секвенировании полноразмерного гена HLA-B, включая интроны, а клиническое значение таких редких аллелей не установлено. Частота встречаемости всех этих аллелей не превышает 0,1%.

3.4. Диагностические характеристики:

- диагностическая чувствительность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов с HLA-B*5701, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 53 пациентов, составила 100% (интервал 93,3% -100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

- диагностическая специфичность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов без HLA-B*5701, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 171 пациентов, составила 100% (интервал 97,9%-100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.5. Повторяемость и воспроизводимость результатов:

При тестировании на одной серии набора, на одном оборудовании, одним оператором двух образцов (отрицательного и положительного по наличию аллеля HLA-B*5701) в 10 повторях каждый, повторяемость составила 100 %.

При тестировании в независимых постановках на трёх разных амплификаторах двумя разными операторами на двух сериях набора отрицательного и положительного по наличию аллеля HLA-B*5701 образцов в 10 повторях каждый межпостановочная, внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость результатов составила 100 %

3.6. Потенциально интерферирующие вещества.

Показано отсутствие влияния потенциально интерферирующих веществ в образцах цельной крови (гемоглобина до 254 г/л, билирубина до 0,2 мг/мл, триглицеридов до 30 мг/мл, альбумина до 90 мг/мл) на результаты анализа.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению аллеля HLA-B*5701, обязаны обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике. К работе с набором допускается только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским, или биологическим образованием, прошедший подготовку

на лицензированных курсах первичной специализации по работе с патогенными для человека микроорганизмами и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики (например, врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант), иной специалист).

4.3. Некоторые компоненты (КО и ОКО) содержат натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором необходимо надевать одноразовые медицинские перчатки, использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с 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».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- регистрирующий амплификатор планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, соответствующий требованиям, описанным в п. 2.3. данной инструкции (например, «CFX96» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США, РУ № ФСЗ 2008/03399), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229) или «FLUORITE» (Xi'an TianLong, Science and Technology Co., Ltd., Китай, РУ № РЗН 2022/16415));
- ПЦР-бокс (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01-"Ламинар-С", ЗАО «Ламинарные системы», Россия, РУ № ФСР 2010/07111);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- мини-шейкер планшетный, обеспечивающий частоту вращения 1200-1800 об/мин (например, «PSU-2Т», BioSan, Латвия, РУ № ФСЗ 2011/09795; «Eppendorf MixMate», Eppendorf AG, Германия, РУ № ФСЗ 2009/04410);
- микроцентрифуга, типа «Eppendorf» для пробирок вместимостью 2 мл, обеспечивающая 13000 об/мин (например, «MiniSpin», Eppendorf Manufacturing Corporation, США, РУ № ФСЗ 2012/13316);
- встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» (например, «Bio-Vortex V-1 plus», BioSan, Латвия, РУ № ФСЗ 2011/09797);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Финляндия, РУ № РЗН 2019/9356);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Финляндия, РУ № РЗН 2020/9707);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопре-новые (например, перчатки «NeoTouch», Ansell HealthCare, Германия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, штативы ООО «НПФ Хеликон», Россия, РУ № РЗН 2022/16372);
- контейнер для сбора отходов («Контейнер для сбора острого инструментария – МК-01 », КМ-Проект, Россия, РУ № РЗН 2017/5395).
- нож канцелярский или ножницы;

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

При проведении работ с клиническими образцами в лаборатории, включая процесс выделения ДНК из них, необходимо обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинических образцов

дельной крови с ЭДТА).

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО и ОКО, которые являются компонентами данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с использованием набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов цельной крови проводить согласно инструкции по применению набора. КО и ОКО проходят процедуру выделения аналогично КО1 и КО2.

Внимание! С момента окончания центрифугирования (п. 7.2.6 Инструкции по применению набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс») до удаления надосадочной жидкости (п. 7.2.7 Инструкции по применению набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс») должно пройти не более 5 минут.

Для элюции использовать элюирующий раствор «Генетика 2», который является компонентом данного набора (п. 7.6 Инструкции по применению набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс»).

6.1.2. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

При выделении ДНК из образцов цельной крови необходимо провести их предварительную обработку с использованием набора реагентов «РеалБест Гемолитик». Предварительной обработке подвергается цельная кровь объемом 50 мкл согласно инструкции по применению набора.

Внимание! С момента окончания центрифугирования (п. 6.7. Инструкции по применению набора «РеалБест Гемолитик») до удаления надосадочной жидкости (п. 6.8. Инструкции по применению набора «РеалБест Гемолитик») должно пройти не более 5 минут.

Выделение ДНК из образцов цельной крови проводить без добавления внутреннего контрольного образца (ВКО).

Процедуру выделения ДНК из образцов КО и ОКО (являются компонентами данного набора) проводить из 30 мкл соответствующего образца.

Элюцию образцов проводить в 200 мкл элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить 250 мкл элюирующего раствора «Генетика 2», входящего в состав данного набора. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту. Установить пробирки в магнитный штатив.

6.1.3. Выделение ДНК с использованием набора реагентов «РеалБест ГенМаг».

Выделение ДНК из образцов цельной крови проводить согласно инструкции по применению набора «РеалБест ГенМаг». ОКО проходит процедуру выделения аналогично КО.

После окончания процедуры пробоподготовки (п. 7.12. Инструкции по применению

лабора «РеалБест ГенМаг») вместо элюирующего раствора «Генетика» использовать элюирующий раствор «Генетика 2» (по 250 мкл), который является компонентом данного набора.

6.1.4. После вскрытия флакона элюирующий раствор «Генетика 2» хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

6.1.5. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-26) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая КО и ОКО) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Неиспользованные пробирки с ГРС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки ГРС хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

КО и ОКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.2. Аккуратно удалить плёнку, закрывающую пробирки.

Внимание! При удалении плёнки следите, чтобы вместе с ней не была удалена ГРС.

В каждую пробирку дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Время от начала внесения в ГРС до запуска ПЦР должно быть не более 30 минут.

Заклеить пробирки оптической плёнкой.

Внимание! Нельзя наносить на оптическую плёнку какие-либо надписи. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200-1800 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

При использовании программного обеспечения прибора:

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК и детекции флуоресцентных сигналов в соответствии с инструкцией к прибору.

Протокол проведения реакции амплификации:

- 1 стадия: 50 °C – 2 минуты;
- 2 стадия: 95 °C – 2 минуты;
- 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд)

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.6. Выбрать каналы для детекции амплификации соответствующих участков ДНК человека:

«FAM» – регистрация сигнала при амплификации фрагмента гена HMBS;

«ROX» – регистрация сигнала при амплификации специфичного для аллеля HLA-B*5701 фрагмента ДНК.

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.8. Запустить амплификатор для выполнения заданного протокола.

При использовании программы «GP.РеалБест Диагностика»:

- Запустить программное обеспечение «GP.РеалБест Диагностика».
- Со вкладыша с информацией ввести данные штрих-кода набора.
- Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами.
- Запустить программу амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

8.1.1. В КО должно фиксироваться:

- нарастание сигнала амплификации ДНК HMBS (канал «FAM») и определяться значение порогового цикла C_t HMBS меньше или равно 30;
- нарастание сигнала, специфичного для аллеля HLA-B*5701 продукта амплификации (канал «ROX») и определяться значение порогового цикла C_t HLA-B*5701.

Для КО рассчитать $\Delta C_t = C_t \text{ HLA-B*5701} - C_t \text{ HMBS}$, которое должно быть меньше или равно **граничному значению**, указанному во вкладыше к конкретной серии набора.

8.1.2. В ОКО должно отсутствовать нарастание сигнала специфичного для аллеля HLA-B*5701 продукта амплификации (канал «ROX»), либо определяемое значение порогового цикла C_t HLA-B*5701 должно быть более 37.

Если для ОКО зарегистрировано значение C_t менее или равно 37 по каналу «ROX», то это свидетельствует о наличии контаминации. В случае контаминации все положительные результаты, для которых в данной индивидуальной постановке ПЦР получено значение C_t по каналу «ROX» более, чем величина, равная значению порогового цикла по каналу «ROX» для

ЖО минус 3 ($Ct\ ROX_n \geq (Ct\ ROX_{око} - 3)$), считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен недостоверный положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать, как отрицательные.

8.2. Валидация образца.

8.2.1. Для каждого исследуемого образца должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации ДНК гена HMBS человека (канал «FAM») и определяться значение порогового цикла Ct HMBS меньше или равно 30.

8.2.2. Для образцов, признанных невалидными (Ct по каналу «FAM» больше 30), необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

Внимание! Анализ результатов исследуемого образца считается действительным только в том случае, если образец признан валидным.

8.3. Анализ результатов выявления аллеля HLA-B*5701.

8.3.1. Для исследуемых образцов, признанных валидными по п. 8.2, в которых фиксируется нарастание сигнала амплификации ДНК HLA-B*5701 (канал «ROX») и определяется значение порогового цикла Ct HLA-B*5701, рассчитать ΔCt , где

$$\Delta Ct = Ct\ HLA-B*5701 - Ct\ HMBS$$

8.3.2. Анализируемый образец учитывается как **положительный**, то есть содержащий аллель HLA-B*5701, если для этого образца значение ΔCt меньше или равно **граничному значению**, указанному во вкладыше к конкретной серии набора.

8.3.3. Анализируемый образец учитывается как **отрицательный**, то есть не содержащий аллель HLA-B*5701, если для этого образца значение ΔCt больше **граничного значения**, указанного во вкладыше к конкретной серии набора, или не фиксируется нарастание сигнала амплификации ДНК HLA-B*5701 и не определяется значение порогового цикла Ct HLA-B*5701.

При использовании программного обеспечения «GP.РеалБест Диагностика» все описанные выше операции по анализу и учёту результатов выполняются программой.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °C. Допускается транспортирование при температуре до 26 °C не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °C в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 18 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. После первого вскрытия упаковки ГРС хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

КО и ОКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

После вскрытия флакона элюирующий раствор «Генетика 2» хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

9.5. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

9.6. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

11. ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023	Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики ин витро. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.
ГОСТ 14971-2021	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

Инструкция по применению и паспорт размещены на сайте <http://www.vector-best.ru>.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика HLA-B*5701», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел.: (383) 252-51-62, 227-60-30; тел./факс: (383) 252-51-81, 252-51-77;

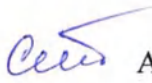
E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

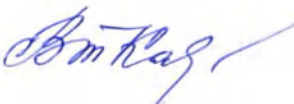
ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

Символ	Описание	Символ	Описание
	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов		Температурный диапазон
	Код партии		Дата изготовления
	Изготовитель		Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Использовать до....	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»

 А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор

 Т.И. Поспелова

М.П.



Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 14 листов.

Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

 Захарова Л.Н.

“01” 10 20 24 г.

