

«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

« 26 » июля 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для качественного определения аллеля 27
локуса В главного комплекса гистосовместимости человека
методом ПЦР в режиме реального времени

АмплиСенс® HLA-B27-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

IVD

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	7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	7
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	12
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	12
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	15
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	15
ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	16
СОСТАВ.....	16
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	16
А. Подготовка проб для амплификации	17
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	18
В. Анализ и интерпретация результатов.....	19
ФОРМА 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L	22
СОСТАВ.....	22
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	22
А. Подготовка проб для амплификации	22
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	23
В. Анализ и интерпретация результатов.....	24
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	27
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	28
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	29

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

АмплиСенс® HLA-B27-FL	– Набор реагентов для качественного определения аллеля 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека методом ПЦР в режиме реального времени АмплиСенс® HLA-B27-FL
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	– дезоксирибонуклеозидтрифосфат
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»
HLA-B27	– аллель 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® HLA-B27-FL предназначен для качественного определения аллеля 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA-B27) в геномной ДНК человека или в биологическом материале (цельная венозная кровь) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Ограничения по применению медицинского изделия в различных популяционных и демографических группах отсутствуют.

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике и может быть применен в медицинской практике в комплексном обследовании пациентов с подозрением на аутоиммунные заболевания, ассоциированные с наличием

аллеля HLA-B27 (анкилозирующий спондилоартрит (болезнь Бехтерева), реактивный артрит (болезнь Рейтера), псориатический артрит, энтеропатический артрит и другие).

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 и может быть применен в медицинской практике в комплексном обследовании пациентов с подозрением на аутоиммунные заболевания, ассоциированные с наличием аллеля HLA-B27 (анкилозирующий спондилоартрит (болезнь Бехтерева), реактивный артрит (болезнь Рейтера), псориатический артрит, энтеропатический артрит и другие).

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на амплификации участков геномной ДНК человека, несущих аллель 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости и ДНК β-глобинового гена человека с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ДНК β-глобинового гена используется в качестве эндогенного внутреннего контроля (ВКО Glob) и позволяет не только контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца, но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения.

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.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация двух ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1.

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	ДНК участка β -глобинового гена (BKO Glob)	HLA-B27
Область амплификации	HBB	HLA-B

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Формы 1 и 2 используются для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли. Форма 2 рассчитана на проведение 48 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, FRT-L	1×10^4

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 наличие или отсутствие аллеля 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании 200 образцов геномной ДНК человека с известным генотипом, определенным методом секвенирования по Сэнгеру. Последовательность секвенированных фрагментов, полученных с использованием метода секвенирования по Сэнгеру, сравнивали с референтной нуклеотидной последовательностью локуса гена HLA-B, несущего аллель 27.

При проведении тестирования неспецифических реакций и неправильного определения наличия или отсутствия аллеля 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости 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 и отрицательных модельных образцов. Для тестирования были использованы два образца с генотипами, определенными испытуемым набором и подтвержденными методом секвенирования по Сэнгеру: образец с аллелем HLA-B27 в качестве положительного и образец дикого типа в качестве отрицательного образца.

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

АмплиСенс® HLA-B27-FL	Генотип	Повторяемость		Воспроизводимость	
		Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Форма 1	Дикий тип	10	100	40	100
	HLA-B27	10	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 4

Результаты тестирования набора реагентов АмплиСенс® HLA-B27-FL в сравнении с референтным методом

Вид исследуемого материала	Результаты применения АмплиСенс® HLA-B27-FL		Результаты применения референтного метода	
			положительных	отрицательных
Геномная ДНК человека	Всего исследовано 40 образцов	положительных	20	0
		отрицательных	0	20

Диагностические характеристики набора реагентов определяли на 40 образцах геномной ДНК человека. В качестве референтного метода использовали секвенирование продуктов амплификации методом Сэнгера.

Таблица 5

Диагностические характеристики набора реагентов АмплиСенс® HLA-B27-FL

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95 %)
Геномная ДНК человека	100 (83,89 – 100) %	100 (83,89 – 100) %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

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 методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

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

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 клиничко-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 набора 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 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. Вакуумные пробирки или одноразовая система для взятия

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

венозной крови для лабораторных исследований *in vitro*.

2. Иглы стерильные двусторонние трубчатые к вакуумным пробиркам для взятия венозной крови для лабораторных исследований *in vitro*.

Предварительная подготовка исследуемого материала

3. Реагент для предобработки цельной венозной крови (например, реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови «ГЕМОЛИТИК» (РУ № ФСР 2010/09505)).
4. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки или завинчивающиеся объемом 1,5 мл.
5. Завинчивающиеся крышки к пробиркам.
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 и 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 надсадочной жидкости.
12. Автоматические дозаторы переменного объема.
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
14. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
15. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

16. Комплект реагентов для экстракции ДНК (например, «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 гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

19. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F:
 - 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, 200 мкл, 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 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), 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.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служит цельная венозная кровь, геномная ДНК человека.

Для получения образцов цельной венозной крови взятие крови провести одноразовой иглой диаметром 0,8-1,1 мм в пробирку (специальную вакуумную систему) с раствором K_2EDTA / K_3EDTA 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 хранение образцов геномной ДНК человека до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 24 часов с момента получения материала;
- при температуре не выше минус 16 °С – не более 1 года.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы геномной ДНК человека не требуют предварительной подготовки и проведения экстракции.

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.

Допускается хранение и транспортирование замороженного осадка:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 2 недель;
- при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.

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

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.

Для контроля эффективности экстракции ДНК и реакции амплификации в наборе реагентов в качестве эндогенного внутреннего контроля используется ДНК β-глобинового гена (ВКО Glob). По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК β-глобинового гена, говорит о достаточной эффективности

экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Потенциально интерферирующие вещества

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

Для оценки влияния эндогенных веществ были протестированы образцы цельной венозной крови с известными генотипами, взятые в пробирки с K_2 ЭДТА / K_3 ЭДТА в качестве антикоагулянта без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, превышающих верхнюю границу нормальной концентрации этих веществ в цельной венозной крови. Для оценки влияния экзогенных веществ (антикоагулянтов) были протестированы образцы цельной венозной крови с известными генотипами, взятые в пробирки с гепарином и в пробирки с K_2 ЭДТА и K_3 ЭДТА в качестве антикоагулянтов. Концентрация веществ указана в табл. 6.

Таблица 6

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация	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	K_2 ЭДТА ⁶	до 2,0 мг/мл	Не обнаружено
	K_3 ЭДТА ⁶		
	Литий гепарин ⁶	от 12 МЕ/мл	<u>Обнаружено</u>

⁶ 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 концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл, литий гепарин – в концентрации 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 продуктов амплификации 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 при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

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 участков гена HLA-B, несущих аллель 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество пробирок, шт
Часть 1 из 2			
К+ ДНК 1	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 HLA-B27	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»).

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 HLA-B27, 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 HLA-B27. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью-FL HLA-B27, ПЦР-буфером-С и полимеразой (TaqF), осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси-FL HLA-B27, 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 оптимальной концентрации.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл К+ ДНК 1.

- б) отрицательный контроль ПЦР (К-) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл К-.
- в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – 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:
 - а) перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе;
 - б) в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.
2. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» и запустить выполнение программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 7):

Таблица 7

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного⁷ и планшетного⁸ 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

⁷ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN).

⁸ Например, CFX 96 (Bio-Rad).

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

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	ДНК участка β-глобинового гена (BKO Glob)	HLA-B27

Анализ полученных результатов амплификации проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

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 (Ct).

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 9

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)		Результат
FAM	JOE	
<u>определено</u> меньше или равно граничному	отсутствует или больше граничного	НЕ обнаружен аллель 27 локуса В
<u>определено</u> меньше или равно граничному	<u>определено</u> меньше или равно граничному	Обнаружен аллель 27 локуса В
отсутствует или больше граничного	определено или отсутствует	Невалидный*

- * В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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. 10 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 10

**Результаты для контролей различных этапов
ПЦР-исследования**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)	
		FAM	JOE
OK	Экстракция ДНК	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного
K-	ПЦР	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного
K+	ПЦР	отсутствует	определено меньше или равно граничному

При наличии отклонений результатов для контролей от указанных выше интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

Возможные ошибки

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE значение порогового цикла (C_t) определено меньше или равно граничному. 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 образцов, в которых обнаружен аллель 27 локуса B.
3. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE значение порогового цикла (C_t) определено меньше или равно граничному.

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 образцов, в которых обнаружена аллель 27 локуса В, начиная с этапа экстракции ДНК.

4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного по каналу для флуорофора FAM, при этом на графике флуоресценции (в режиме просмотра необработанных («сырых») данных) отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Это может свидетельствовать об отсутствии в анализируемом образце геномной ДНК человека. Требуется повторно провести ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ФОРМА 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L – комплект реагентов для амплификации участков гена HLA-B, несущих аллель 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество пробирок, шт
ПЦР-смесь HLA-B27-Lyo	Порошок белого цвета	-	48
К+ ДНК 1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1

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»

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 $1,2 \times 10^5$ – $3,6 \times 10^5$ копий/мл).

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью HLA-B27-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество

- контрольных образцов см. в п. 3).
2. В подготовленные пробирки внести по 25 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и разведенных до оптимальной концентрации.
 3. Поставить контрольные реакции:
 - а) положительный контроль ПЦР (К+) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл К+ ДНК 1 и 15 мкл К–.
 - б) отрицательный контроль ПЦР (К–) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл К–.
 - в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

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

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется:
 - а) перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе;
 - б) в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.
2. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» и запустить выполнение программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 11):

Таблица 11

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс»
для приборов роторного⁹ и планшетного¹⁰ 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 12

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	ДНК участка β-глобинового гена (BKO Glob)	HLA-B27

Анализ полученных результатов амплификации проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

⁹ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN).

¹⁰ Например, CFX 96 (Bio-Rad).

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).

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 13

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)		Результат
FAM	JOE	
<u>определено</u> меньше или равно граничному	отсутствует или больше граничного	НЕ обнаружен аллель 27 локуса В
<u>определено</u> меньше или равно граничному	<u>определено</u> меньше или равно граничному	Обнаружен аллель 27 локуса В
отсутствует или больше граничного	определено или отсутствует	Невалидный*

- * В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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. 14 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 14

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного
К–	ПЦР	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного
К+	ПЦР	отсутствует	<u>определено</u> меньше или равно граничному

Возможные ошибки

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE значение порогового цикла (Ct) определено меньше или равно граничному. 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 образцов, в которых обнаружен аллель 27 локуса B.
3. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE значение порогового цикла (Ct) определено меньше или равно граничному. 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 образцов, в которых обнаружена аллель 27 локуса B, начиная с этапа экстракции ДНК.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (Ct) меньше граничного по каналу для флуорофора FAM, при этом на графике флуоресценции (в режиме просмотра необработанных («сырых») данных) отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Это может свидетельствовать об отсутствии в анализируемом образце геномной ДНК человека. Требуется повторно провести ПЦР-исследование для этого образца, 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. Транспортирование проводить в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Набор реагентов форма 1 (часть 1 и часть 2) транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 10 сут, допускается транспортирование при температуре от 2 до 26 °С не более 5 сут.

Набор реагентов форма 2 транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности, допускается транспортирование при температуре от 2 до 26 °С не более 10 сут.

Хранение.

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

- часть 1 (К+ ДНК 1, К–, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С;
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL HLA-B27, ПЦР-буфер-С, полимеразы (TaqF)) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL HLA-B27 хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь HLA-B27-Lyo после вскрытия вакуумной упаковки хранить в закрытом Zip-lock пакете с влагопоглотителем 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.ru⁴.

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 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.

⁴ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно



Код партии



Содержимого достаточно для проведения <n> тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



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



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления



Не допускать воздействия влаги

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 29
двадцать девять лист 06

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



«26» 21 2024 г.

А.О.Лисицына

М.П.

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 29 листа(ов)
Директор ГБУЗ МО МОНИКИ
им.М.Ф.Владимирского
Соболев К.Э.





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



Краткое руководство

набор реагентов АмплиСенс® HLA-B27-FL

Форма 1: **REF** S-3731-1

Форма 2: **REF** S-3732-1-4



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, контролей и элюции	
При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:	
Исследуемые образцы	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 1 положительный (K+) 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 HLA-B27.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL HLA-B27	$10 \cdot (N+K+1)$	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-исследования.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь хранить не более 2 ч.

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК 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, ОК
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	
K+ ДНК 1	в пробирку для K+
K-	в пробирку для K-

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

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

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный (K+) и 1 отрицательный (K-) контроли ПЦР; 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

- Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью HLA-B27-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

Внести по 25 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов и разведенных до концентрации 10-30 нг в реакцию	в пробирки для исследуемых образцов, ОК
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	
10 мкл K+ ДНК 1 и 15 мкл K-	в пробирку для K+
K-	в пробирку для K-

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется:
 - а) перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе,
 - б) в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.
- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» и запустить выполнение программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала.

Единая программа амплификации «АмплиСенс»				
Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во 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.

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Флуорофор	FAM	JOE
Мишень для амплификации	ДНК участка β-глобинового гена (BKO Glob)	HLA-B27

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

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2

лист 2

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



«16» 08

2024 г.

М.П.

А.О.Лисицына

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набор реагентов для качественного определения аллеля 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека методом ПЦР в режиме реального времени АмплиСенс® HLA-B27-FL

Форма 1	LOT 17.05.24	 2024-05-17
		 2025-08-17

ТУ 21.20.23-373-01897593-2023.

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 Ct отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE	соответствует
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE	соответствует
Положительный результат для образца К+ (положительный контроль ПЦР)	Отсутствует значение Ct по каналу для флуорофора FAM, определено значение Ct не более или равно граничному по каналу для флуорофора JOE	соответствует
Отрицательный или положительный результат для 4-х тестируемых образцов ДНК человека	Определено значение Ct не более граничного по каналу для флуорофора FAM, отсутствует или определено значение Ct по каналу для флуорофора JOE	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
ПЦР-смесь-FL HLA-B27	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1
ПЦР-смесь HLA-B27-Lyo	Порошок белого цвета	соответствует	2
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К+ ДНК 1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Транспортирование проводить в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Набор реагентов форма 1 (часть 1 и часть 2) транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 10 сут, допускается транспортирование при температуре от 2 до 26 °С не более 5 сут.

Набор реагентов форма 2 транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности, допускается транспортирование при температуре от 2 до 26 °С не более 10 сут.

Хранение.

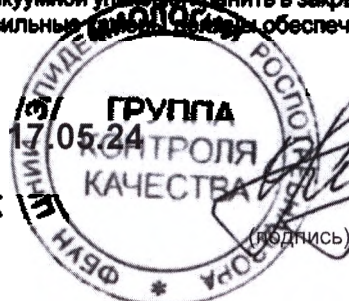
Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей по температуре хранения:

- часть 1 (К+ ДНК 1, К-, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С;
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL HLA-B27, ПЦР-буфер-С, полимераза (TaqF)) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL HLA-B27 хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь HLA-B27-Lyo после вскрытия вакуумной упаковки хранить в закрытом Zip-lock пакете с влагопоглотителем в защищенном от света месте. Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

Руководитель ГKK



(Коды О.И.)
(Ф.И.О.)

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набор реагентов для качественного определения аллеля 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека методом ПЦР в режиме реального времени АмплиСенс® HLA-B27-FL

Форма 1	LOT A17.05.24	 2024-05-17
		 2025-08-17

ТУ 21.20.23-373-01897593-2023.

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, JOE	соответствует
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE	соответствует
Положительный результат для образца К+ (положительный контроль ПЦР)	Отсутствует значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM, определено значение <i>Ct</i> не более или равно граничному по каналу для флуорофора JOE	соответствует
Отрицательный или положительный результат для 4-х тестируемых образцов ДНК человека	Определено значение <i>Ct</i> не более граничного по каналу для флуорофора FAM, отсутствует или определено значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора JOE	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
ПЦР-смесь-FL HLA-B27	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1
ПЦР-смесь HLA-B27-Lyo	Порошок белого цвета	соответствует	2
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К+ ДНК 1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Транспортирование проводить в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Набор реагентов форма 1 (часть 1 и часть 2) транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 10 сут, допускается транспортирование при температуре от 2 до 26 °С не более 5 сут.

Набор реагентов форма 2 транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности, допускается транспортирование при температуре от 2 до 26 °С не более 10 сут.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей по температуре хранения:

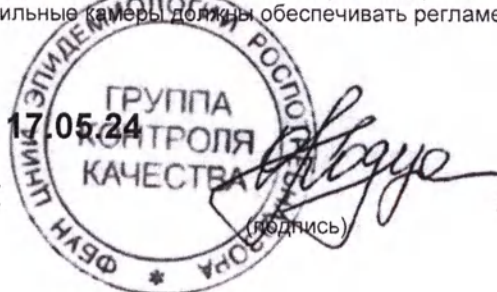
- часть 1 (К+ ДНК 1, К-, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С;
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL HLA-B27, ПЦР-буфер-С, полимераза (TaqF)) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL HLA-B27 хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь HLA-B27-Lyo после вскрытия вакуумной упаковки хранить в закрытом Zip-lock пакете с влагопоглотителем в защищенном от света месте. Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

17.05.24

Руководитель ГKK



(Подпись)
(Коды О.И.)
(Ф.И.О.)

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набор реагентов для качественного определения аллеля 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека методом ПЦР в режиме реального времени АмплиСенс® HLA-B27-FL

Форма 2	LOT 30.05.24	 2024-05-30
		 2025-08-30

TU 21.20.23-373-01897593-2023.

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 Ct отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE	соответствует
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE	соответствует
Положительный результат для образца К+ (положительный контроль ПЦР)	Отсутствует значение Ct по каналу для флуорофора FAM, определено значение Ct не более или равно граничному по каналу для флуорофора JOE	соответствует
Отрицательный или положительный результат для 4-х тестируемых образцов ДНК человека	Определено значение Ct не более граничного по каналу для флуорофора FAM, отсутствует или определено значение Ct по каналу для флуорофора JOE	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
ПЦР-смесь-FL HLA-B27	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1
ПЦР-смесь HLA-B27-Lyo	Порошок белого цвета	соответствует	2
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К+ ДНК 1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Транспортирование проводить в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Набор реагентов форма 1 (часть 1 и часть 2) транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 10 сут, допускается транспортирование при температуре от 2 до 26 °С не более 5 сут.

Набор реагентов форма 2 транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности, допускается транспортирование при температуре от 2 до 26 °С не более 10 сут.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей по температуре хранения:

- часть 1 (К+ ДНК 1, К-, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С;
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL HLA-B27, ПЦР-буфер-С, полимераза (TaqF)) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL HLA-B27 хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь HLA-B27-Lyo после вскрытия вакуумной упаковки хранить в закрытом Zip-lock пакете с влагопоглотителем в защищенном от света месте. Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

30.05.24

Руководитель ГКК



(Кодва О.И.)
(Ф.И.О.)

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набор реагентов для качественного определения аллеля 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека методом ПЦР в режиме реального времени АмплиСенс® HLA-B27-FL

Форма 2	LOT A30.05.24	 2024-05-30
		 2025-08-30

ТУ 21.20.23-373-01897593-2023.

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 C_t отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE	соответствует
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение C_t отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE	соответствует
Положительный результат для образца К+ (положительный контроль ПЦР)	Отсутствует значение C_t по каналу для флуорофора FAM, определено значение C_t не более или равно граничному по каналу для флуорофора JOE	соответствует
Отрицательный или положительный результат для 4-х тестируемых образцов ДНК человека	Определено значение C_t не более граничного по каналу для флуорофора FAM, отсутствует или определено значение C_t по каналу для флуорофора JOE	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
ПЦР-смесь-FL HLA-B27	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1
ПЦР-смесь HLA-B27-Lyo	Порошок белого цвета	соответствует	2
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К+ ДНК 1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Транспортирование проводить в термоконтейнерах, содержащих холодоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Набор реагентов форма 1 (часть 1 и часть 2) транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 10 сут, допускается транспортирование при температуре от 2 до 26 °С не более 5 сут.

Набор реагентов форма 2 транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности, допускается транспортирование при температуре от 2 до 26 °С не более 10 сут.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей по температуре хранения:

- часть 1 (К+ ДНК 1, К-, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С;
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL HLA-B27, ПЦР-буфер-С, полимераза (TaqF)) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL HLA-B27 хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь HLA-B27-Lyo после вскрытия вакуумной упаковки хранить в закрытом Zip-lock пакете с влагопоглотителем в защищенном от света месте. Холодильные и морозильные камеры обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

Руководитель ГКК



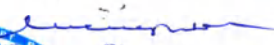
(Кодва О.И.)
(Ф.И.О.)

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: четыре лист 2

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



 А.О.Лисицына



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
АмплиСенс® HLA-B27-FL

Форма 1 **REF** S-3731-1

Форма 2 **REF** S-3732-1-4

LOT 17.05.24

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000/Q

Канал	Gain Optimisation... / Опт.уровня сигнала	Outlier Removal/ Устранение выбросов	Slope Correct/ Коррект. уклона	Dynamic tube/ Динамич.фон
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	10%	включена	включена
JOE/Yellow	от 5 FI до 10 FI	30%	включена	включена

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/сек.*

ДТ-96/«ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Канал	Критерий положительного результата ЦРР	Величина Threshold	Нижняя граница/порог положительного результата	Верхняя граница/порог нормализации данных	Нормализация данных	Фильтрация (отказывание) данных
С(Ср) Для всех каналов	Пороговый (Ct)	Fam, Hex/ RoG	90 %	10 SID	10 % F(Cp)	10 % F(Cp)	Не используется	Отключить

Установка пороговой линии для приборов роторного и планшетного типа

Канал	Threshold/Порог
FAM/Green	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для исследуемых образцов
JOE/Yellow/HEX	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК1

Граничные значения порогового цикла Ct для приборов роторного и планшетного типа

Образец	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
К+	Отсутствует или >38	≤31
К-	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
OK	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
Исследуемый образец	≤38	≤35



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
АмплиСенс® HLA-B27-FL

Форма 1 **REF** S-3731-1

Форма 2 **REF** S-3732-1-4

LOT 17.05.24

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000/Q

Канал	Gain Optimisation... / Опт.уровня сигнала	Outlier Removal/ Устранение выбросов	Slope Correct/ Коррект. уклона	Dynamic tube/ Динамич.фон
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	10%	включена	включена
JOE/Yellow	от 5 FI до 10 FI	30%	включена	включена

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/сек.*

ДТ-96/«ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Канал	Критерий положительного результата ЦРР	Величина Threshold	Нижняя граница/порог положительного результата	Верхняя граница/порог нормализации данных	Нормализация данных	Фильтрация (отказывание) данных
С(Ср) Для всех каналов	Пороговый (Ct)	Fam, Hex/ RoG	90 %	10 SID	10 % F(Cp)	10 % F(Cp)	Не используется	Отключить

Установка пороговой линии для приборов роторного и планшетного типа

Канал	Threshold/Порог
FAM/Green	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для исследуемых образцов
JOE/Yellow/HEX	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК1

Граничные значения порогового цикла Ct для приборов роторного и планшетного типа

Образец	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
К+	Отсутствует или >38	≤31
К-	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
OK	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
Исследуемый образец	≤38	≤35



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
АмплиСенс® HLA-B27-FL

Форма 1 **REF** S-3731-1

Форма 2 **REF** S-3732-1-4

LOT A17.05.24

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000/Q

Канал	Gain Optimisation... / Опт.уровня сигн	Outlier Removal/ Устранение выбросов	Slope Correct/ Коррект. уклона	Dynamic tube/ Динамич.фон
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	10%	включена	включена
JOE/Yellow	от 5 FI до 10 FI	30%	включена	включена

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
Сt(Ср) Для всех каналов	Пороговый (Ct)	Fam, Hex/ R6G	90 %	10 StD	10 % F(Cp)	10 % F(Cp)	Не используется	Отключить

Установка пороговой линии для приборов роторного и планшетного типа

Канал	Threshold/Порог
FAM/Green	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для исследуемых образцов
JOE/Yellow/HEX	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК1

Граничные значения порогового цикла Ct для приборов роторного и планшетного типа

Образец	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
К+	Отсутствует или >38	≤31
К–	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
ОК	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
Исследуемый образец	≤38	≤35



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
АмплиСенс® HLA-B27-FL

Форма 1 **REF** S-3731-1

Форма 2 **REF** S-3732-1-4

LOT A17.05.24

Настройки для приборов роторного типа

Rotor- Gene 3000/6000/Q

Канал	Gain Optimisation... / Опт.уровня сигн	Outlier Removal/ Устранение выбросов	Slope Correct/ Коррект. уклона	Dynamic tube/ Динамич.фон
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	10%	включена	включена
JOE/Yellow	от 5 FI до 10 FI	30%	включена	включена

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
Сt(Ср) Для всех каналов	Пороговый (Ct)	Fam, Hex/ R6G	90 %	10 StD	10 % F(Cp)	10 % F(Cp)	Не используется	Отключить

Установка пороговой линии для приборов роторного и планшетного типа

Канал	Threshold/Порог
FAM/Green	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для исследуемых образцов
JOE/Yellow/HEX	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК1

Граничные значения порогового цикла Ct для приборов роторного и планшетного типа

Образец	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
К+	Отсутствует или >38	≤31
К–	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
ОК	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
Исследуемый образец	≤38	≤35



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
АмплиСенс® HLA-B27-FL

Форма 1 **REF** S-3731-1

Форма 2 **REF** S-3732-1-4

LOT 30.05.24

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000/Q

Канал	Gain Optimisation... / Опт.уровня сигн	Outlier Removal/ Устранение выбросов	Slope Correct/ Коррект. уклона	Dynamic tube/ Динамич.фон
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	10%	включена	включена
JOE/Yellow	от 5 FI до 10 FI	30%	включена	включена

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) Для всех каналов	Пороговый (Ct)	Fam, Hex/ R6G	90 %	10 StD	10 % F(Cp)	10 % F(Cp)	Не используется	Отключить

Установка пороговой линии для приборов роторного и планшетного типа

Канал	Threshold/Порог
FAM/Green	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для исследуемых образцов
JOE/Yellow/HEX	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК1

Граничные значения порогового цикла Ct для приборов роторного и планшетного типа

Образец	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
К+	Отсутствует или >38	≤31
К–	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
ОК	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
Исследуемый образец	≤38	≤35



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
АмплиСенс® HLA-B27-FL

Форма 1 **REF** S-3731-1

Форма 2 **REF** S-3732-1-4

LOT 30.05.24

Настройки для приборов роторного типа

Rotor- Gene 3000/6000/Q

Канал	Gain Optimisation... / Опт.уровня сигн	Outlier Removal/ Устранение выбросов	Slope Correct/ Коррект. уклона	Dynamic tube/ Динамич.фон
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	10%	включена	включена
JOE/Yellow	от 5 FI до 10 FI	30%	включена	включена

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) Для всех каналов	Пороговый (Ct)	Fam, Hex/ R6G	90 %	10 StD	10 % F(Cp)	10 % F(Cp)	Не используется	Отключить

Установка пороговой линии для приборов роторного и планшетного типа

Канал	Threshold/Порог
FAM/Green	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для исследуемых образцов
JOE/Yellow/HEX	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ ДНК1

Граничные значения порогового цикла Ct для приборов роторного и планшетного типа

Образец	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
К+	Отсутствует или >38	≤31
К–	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
ОК	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
Исследуемый образец	≤38	≤35

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
АмплиСенс® HLA-B27-FL

Форма 1 **REF** S-3731-1

Форма 2 **REF** S-3732-1-4

LOT A30.05.24

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000/Q

Канал	Gain Optimisation... / Опт.уровня сигн	Outlier Removal/ Устранение выбросов	Slope Correct/ Коррект. уклона	Dynamic tube/ Динамич.фон
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	10%	включена	включена
JOE/Yellow	от 5 FI до 10 FI	30%	включена	включена

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) Для всех каналов	Пороговый (Ct)	Fam, Hex/ R6G	90 %	10 StD	10 % F(Cp)	10 % F(Cp)	Не используется	Отключить

Установка пороговой линии для приборов роторного и планшетного типа

Канал	Threshold/Порог
FAM/Green	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для исследуемых образцов
JOE/Yellow/HEX	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K+ ДНК1

Граничные значения порогового цикла Ct для приборов роторного и планшетного типа

Образец	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
K+	Отсутствует или >38	≤31
K-	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
OK	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
Исследуемый образец	≤38	≤35

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
АмплиСенс® HLA-B27-FL

Форма 1 **REF** S-3731-1

Форма 2 **REF** S-3732-1-4

LOT A30.05.24

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000/Q

Канал	Gain Optimisation... / Опт.уровня сигн	Outlier Removal/ Устранение выбросов	Slope Correct/ Коррект. уклона	Dynamic tube/ Динамич.фон
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	10%	включена	включена
JOE/Yellow	от 5 FI до 10 FI	30%	включена	включена

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) Для всех каналов	Пороговый (Ct)	Fam, Hex/ R6G	90 %	10 StD	10 % F(Cp)	10 % F(Cp)	Не используется	Отключить

Установка пороговой линии для приборов роторного и планшетного типа

Канал	Threshold/Порог
FAM/Green	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для исследуемых образцов
JOE/Yellow/HEX	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K+ ДНК1

Граничные значения порогового цикла Ct для приборов роторного и планшетного типа

Образец	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
K+	Отсутствует или >38	≤31
K-	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
OK	Отсутствует или >38	Отсутствует или >37
Исследуемый образец	≤38	≤35

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 4
четыре лист а

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



А.О.Лисицына

20 24 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

«01» сентября 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

стандартного образца предприятия № 216 «Положительный
контрольный образец, содержащий ДНК генов человека,
гомозиготы-1»
(СОП № 216 ДНК 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

1 ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ

1.1 Инструкция устанавливает порядок и условия применения стандартного образца предприятия № 216 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК генов человека, гомозиготы-1» (СОП № 216 ДНК 1), далее по тексту СОП, предназначенного для проведения испытаний методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией наборов реагентов АмплиСенс® Гемохроматоз-FL, АмплиСенс® F2/F5-SNP-FL, АмплиСенс® MTHFR-SNP-FL, АмплиСенс® HLA-B27-FL.

1.2. Проверку упаковки, маркировки и целостности СОП проводят путем внешнего осмотра.

2 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ. УДАЛЕНИЕ ОТХОДОВ

При работе с СОП и при постановке ПЦР следует соблюдать положения МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку 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».

3 МАТЕРИАЛЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И УСЛОВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

3.1 Материалы и оборудование, необходимые для проведения анализа, согласно ТУ и/или инструкции к испытываемому набору реагентов.

3.2 Реагенты из испытываемого набора реагентов.

3.3 Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.

4 ПОДГОТОВКА К ПРИМЕНЕНИЮ

Перед началом работы достать из холодильника пробирку с СОП и дать нагреться до комнатной температуры. СОП должен представлять собой

прозрачную жидкость, не содержащую каких-либо включений или примесей. Оценить визуально.

5 ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

5.1 Содержимое пробирки с СОП перемешать и осадить капли на вихрексе. Открыть пробирку и, используя наконечник с аэрозольным барьером, отобрать необходимый объем (см. следующий пункт), пробирку закрыть.

5.2 Приготовить разведения, указанные в ТУ / методике испытаний набора реагентов, с использованием ТЕ-буфера, приложенного к СОП.

Примечание – Для пересчета из копии/мл в ГЭ/мл в необходимо использовать коэффициент из инструкции по применению испытываемого набора реагентов.

Разведения готовить по следующей схеме:

- 1) исходный препарат, имеющий концентрацию $N \times 10^m$, развести N-кратно до ближайшего разведения 10^m с коэффициентом 1 (1×10^m).

Разведение провести согласно расчету, с использованием следующих формул:

$$N \times 10^m / 1 \times 10^m = N \quad (1)$$

$$C/N=A \quad (2)$$

$$C-A=B \quad (3), \text{ где}$$

$N \times 10^m$ – исходная концентрация СОП,

1×10^m - ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 копий/мл.

N – во сколько раз необходимо развести исходный препарат, для того чтобы получить ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 (при необходимости полученное число округлить до целого),

A – объем исходного СОП, который необходимо взять для приготовления C мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл),

B – объем ТЕ-буфера, который необходимо взять для приготовления C мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл);

C – объем раствора, содержащий СОП в концентрации 1×10^m .

- 2) Полученный препарат СОП с концентрацией 1×10^m копий/мл развести последовательно десятикратно до получения первого разведения СОП с концентрацией, указанной в ТУ / методике испытаний набора реагентов;
- 3) Из полученного первого разведения СОП с коэффициентом 1, приготовить последующие разведения, указанные в ТУ/методике испытаний, путем последовательных двукратных, пятикратных и/или десятикратных разведений.

Например, СОП имеет концентрацию 5×10^5 копий/мл, необходимо подготовить разведение с концентрацией 1×10^5 , 1×10^4 копий/мл:

- промаркировать пробирки вместимостью 1,5 мл « 1×10^5 », « 1×10^4 »;

- рассчитать объем ТЕ-буфера, который необходимо внести в пробирку, для получения концентрации препарата, равной 1×10^5 копий/мл:

$$5 \times 10^5 \text{ копий/мл} / 1 \times 10^5 \text{ копий/мл} = 5 \quad (1)$$

$$100 \text{ (мкл)} / 5 = 20 \text{ (мкл)} \quad (2)$$

$$100 \text{ мкл} - 20 \text{ мкл} = 80 \text{ (мкл)} \quad (3);$$

- в пробирку, маркированную « 1×10^5 », внести автоматическим дозатором, используя отдельный наконечник с аэрозольным барьером, 80 мкл ТЕ-буфера и 20 мкл исходного СОП. При внесении СОП в буфер пипетировать вносимый

реагент не менее 5 раз, тщательно перемешать и осадить на вортексе, чтобы удалить капли с крышки пробирки;

- в пробирку, маркированную «1x10⁴», внести автоматическим дозатором, используя отдельный наконечник с аэрозольным барьером, 90 мкл ТЕ-буфера и 10 мкл СОП, имеющего концентрацию «1x10⁵». При внесении СОП в буфер пипетировать вносимый реагент не менее 5 раз, тщательно перемешать и осадить на вортексе, чтобы удалить капли с крышки пробирки.

Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию не менее 1x10³ копий/мл, можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение мес. Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию менее 1x10³ копий/мл, хранению не подлежат и готовятся заново из разведения СОП с концентрацией 1x10³ копий/мл.

5.3 Далее провести анализ разведений СОП в соответствии с ТУ / методикой испытаний набора реагентов.

6 ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ

Реагент	Объем, мл	Количество
СОП № 216 ДНК 1	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	1,5	1 пробирка

7 СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

В соответствии со свидетельством на СОП. Срок годности и условия хранения, вскрытого СОП соответствует сроку годности и условиям хранения невскрытого стандартного образца предприятия.

8 АДРЕСА ДЛЯ СПРАВOK И РЕКЛАМАЦИЙ

Рекламации направлять в адрес производителя: 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, тел. (495) 974-96-42.

СВИДЕТЕЛЬСТВО

на стандартный образец предприятия № 216
«Положительный контрольный образец, содержащий ДНК генов человека,
гомозиготы-1»
(СОП № 216 ДНК 1)

Реагент	Серия	Срок годности
СОП № 216 ДНК 1	22.06.22/20.10.22/108	2032-06-22

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Стандартный образец предприятия № 216 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК генов человека, гомозиготы-1» (СОП № 216 ДНК 1), предназначен для проведения испытаний методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией наборов реагентов АмплиСенс® Гемохроматоз-FL, АмплиСенс® F2/F5-SNP-FL, АмплиСенс® HLA-B27-FL, АмплиСенс® MTHFR-SNP-FL.

2 ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ

СОП № 216 ДНК 1 представляет собой прозрачный бесцветный раствор смеси плазмид, содержащих фрагменты ДНК генов человека с полиморфизмами rs1800562, rs1799945, rs6025, rs1799963, rs1801133, rs1801131, HLA B27, является:

- гомозиготой GG по полиморфизму rs1799963,
- гомозиготой GG по полиморфизму rs6025,
- гомозиготой CC по полиморфизму rs1799945,
- гомозиготой GG по полиморфизму rs1800562,
- гомозиготой CC по полиморфизму rs1801133,
- гомозиготой AA по полиморфизму rs1801131,
- гомозиготой по аллелю 27 локуса HLA-B.

3 АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Концентрация ДНК генов человека 5×10^5 копий/мл (5,7 lg копий/мл, стандартное отклонение 0,03 lg копий/мл) для каждого фрагмента.

4 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение срока годности. Транспортировать при температуре от 2 до 8 °C не более 5 сут.

5 РИСКИ И МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

СОП № 216 ДНК 1 не содержит запрещенных к пересылке наземным или авиатранспортом взрывоопасных, наркотических, психотропных, токсичных веществ и инфекционных агентов.

При работе следует соблюдать положения МУ 1.3.2569-09 [1] и меры безопасности, указанные в инструкции по применению данного стандартного образца предприятия.

6 ДОКУМЕНТ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ПОРЯДОК И УСЛОВИЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Инструкция по применению стандартного образца предприятия № 216 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК генов человека, гомозиготы-1» (СОП № 216 ДНК 1).

7 ПРОЦЕДУРА ПРИГОТОВЛЕНИЯ И КОНТРОЛЬ ПРОДУКТА

- 7.1 Для приготовления СОП № 216 ДНК 1 используют КР C282Y-G, КР H63D-C, КР FV-G, КР FII rs1799963 G, КР MTHFR-C, КР 1131 A, КР HLA.
- 7.2 КР C282Y-G, КР H63D-C, КР FV-G, КР FII rs1799963 G, КР MTHFR-C, КР 1131 A, КР HLA были получены путем клонирования фрагментов ДНК генов человека, содержащих полиморфизмы rs1800562, rs1799945, rs6025, rs1799963, rs1801133, rs1801131, HLA B27 в модифицированные векторы, в клетках *E.coli*. Специфичность клонированных фрагментов подтверждена методом прямого секвенирования. Полученные последовательности соответствуют опубликованным референтным последовательностям [2].
- 7.3 Полученные препараты плазмид протестированы с помощью *in house* методики, основанной на методе лимитирующих разведений, предложенном *Taswell C.*, 1981 [3] и *Rodrigo A.G et al.*, 1997 [4].
- 7.4 Для приготовления СОП № 216 ДНК 1 КР C282Y-G, КР H63D-C, КР FV-G, КР FII rs1799963 G, КР MTHFR-C, КР 1131 A, КР HLA разводят в ДНК-буфере с poly A до требуемой концентрации каждого КР.
- 7.5 Приготовленный СОП № 216 ДНК 1 фасуют в соответствии с объемом, указанным в инструкции по применению данного стандартного образца и хранят в соответствии с настоящим свидетельством.
- 7.6 В соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 15194-2013 [5] проводят аттестацию СОП № 216 ДНК 1 данной серии по схеме, описанной в п. 5.6 ГОСТ ISO 17511-2011 [6]. См. приложение 1.

8 БИБЛИОГРАФИЯ

1. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности»
2. Референсные нуклеотидные последовательности:
 - гена F2 для полиморфизма 20210 G>A rs1799963:
 - гена F5 для полиморфизма R534Q G>A rs6025:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6025
 - гена HFE для полиморфизма C282Y 845G>A rs1800562:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1800562
 - гена HFE для полиморфизма H63D 187C>G rs1799945:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1799945
 - гена MTHFR для полиморфизма A222V, C>T rs1801133:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1801133
 - гена MTHFR для полиморфизма E429A, A>C rs1801131:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1801131
 - аллеля 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA-B27): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X03945.1>
3. *Taswell C.* Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. // *J. Immunology*, 1981, vol. 126, pp. 1614-1619
4. *Allen G. Rodrigo, Paul C. Goracke, Kiarash Rowhanian, James I. Mullins.* Quantitation of target molecules from polymerase chain reaction-based limiting dilution assays. // *AIDS research and human retroviruses*, 1997, vol. 13(9). pp. 737-742.
5. ГОСТ Р ИСО 15194-2013 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в пробах биологического происхождения. Требования к аттестованным стандартным образцам и содержанию сопроводительной документации»

6. ГОСТ ISO 17511-2011 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам».

Старший технолог УКО
НПЛ ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

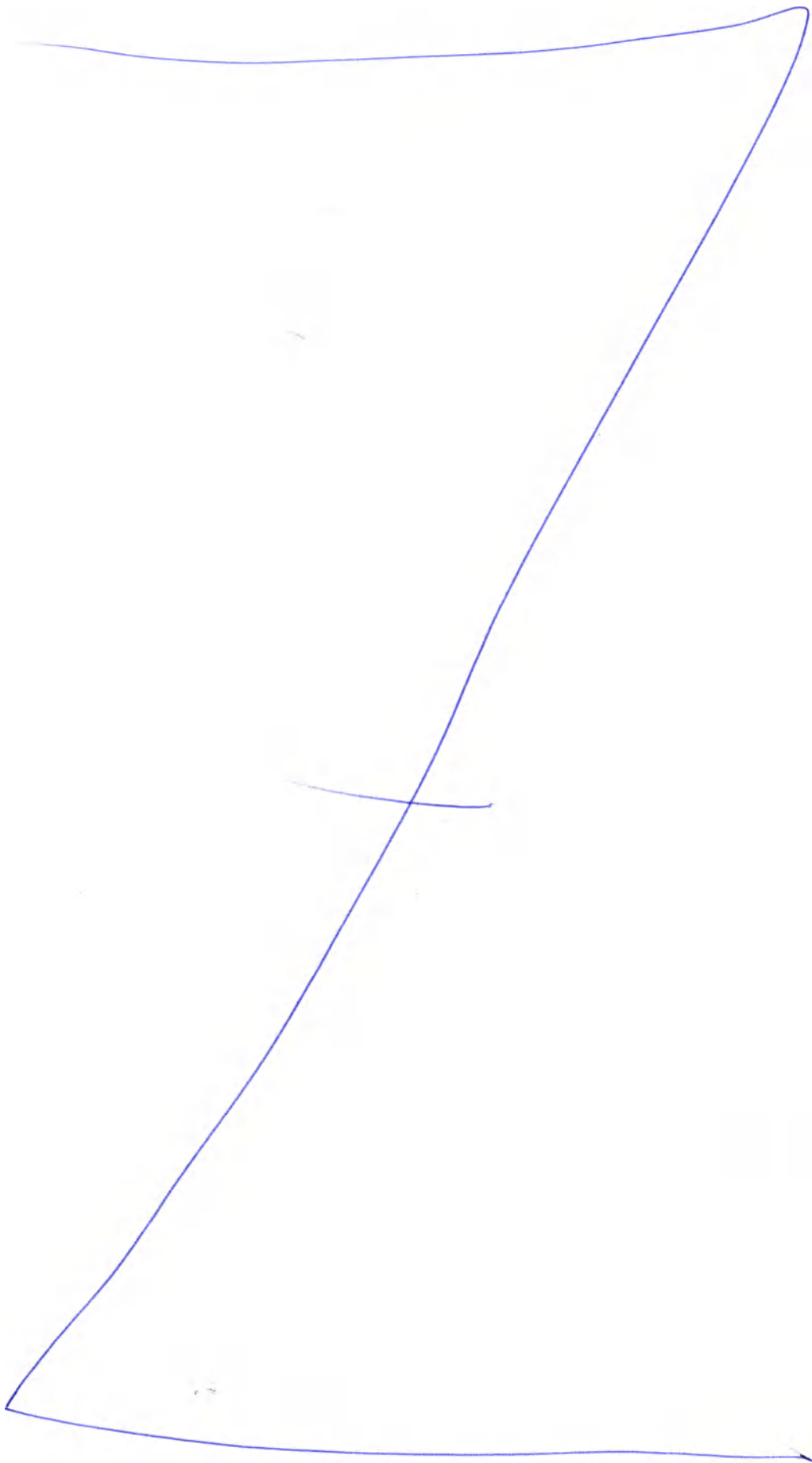
Самарова

Самарова Е.А.

«01» сентября 2023 г.

Отчет об измерении
по п. 5.6 ГОСТ ISO 17511-2011

Выбранная производителем методика выполнения измерений	Тестирование с помощью in house методики, основанной на методе лимитирующих разведений
Тестируемый образец (рабочий калибратор производителя)	СОП № 216 ДНК 1
Серия	22.06.22/20.10.22/108
Дата измерения	07.07.22
концентрация, копий/мл	5×10^5
концентрация, lg копий/мл	5,7
Стандартное отклонение (SD), lg копий/мл	0,03



Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 5
пять лист 06

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

« 16 » 08 2024 г. А.О.Лисицына

