

«УТВЕРЖДАЮ»

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



А.В. Горелов

« 12 » декабря 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для диагностики in vitro

АмплиСенс® MTHFR-SNP-FL

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	11
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	14
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	14
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	15
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	16
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	17
ФОРМА 1 («ПЦР-КОМПЛЕКТ» ВАРИАНТ FRT-50 F).....	18
СОСТАВ	18
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	18
А. Подготовка проб для амплификации	19
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	20
В. Анализ и интерпретация результатов	21
ФОРМА 2 («ПЦР-КОМПЛЕКТ» ВАРИАНТ FRT-L).....	26
СОСТАВ	26
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	26
А. Подготовка проб для амплификации	27
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	27
В. Анализ и интерпретация результатов	28
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	33
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	33
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	35

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	– дезоксирибонуклеозидтрифосфат
K+	– положительный контроль ПЦР
K–	– отрицательный контроль ПЦР
OK	– отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПО	– программное обеспечение
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
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
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
rs	– reference SNP (идентификационный номер полиморфного ДНК-локуса в международных базах данных SNP)
SNP	– single nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс[®] MTHFR-SNP-FL, далее – набор реагентов, предназначен для качественного определения генотипов по полиморфизмам A222V C>T (rs1801133) и E429A A>C (rs1801131) в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) в биологическом материале (цельная венозная кровь) человека методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов может быть применен в медицинской практике для определения генетической предрасположенности к нарушению метаболизма фолатов, гипергомоцистемии и развитию тромбозов, а также для изучения генетики других мультифакторных заболеваний, ассоциированных с определяемыми полиморфизмами.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

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

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на амплификации участков геномной ДНК человека, содержащих генетические полиморфизмы A222V C>T (rs1801133) и E429A A>C (rs1801131) в гене MTHFR, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это 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. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку дезоксиуридинтрифосфат входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

Аллель-специфичные флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды позволяют определять гомо- и гетерозиготное состояние по анализируемым генетическим полиморфизмам. Определение аллелей полиморфизмов осуществляется по следующим каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
ДНК-мишень	rs1801133 аллель С	rs1801133 аллель Т	rs1801131 аллель А	rs1801131 аллель С

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Формы 1 и 2 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

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 генотипы по полиморфизмам rs1801133 и rs1801131 в гене MTHFR. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании 200 образцов геномной ДНК человека с известным генотипом, определенным методом секвенирования с использованием пиросеквенатора PyroMark Q24.

При проведении тестирования неспецифических реакций и неправильного определения генотипов по полиморфизмам rs1801133 и rs1801131 в гене MTHFR в исследуемых образцах выявлено не было.

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

Повторяемость, воспроизводимость

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования трех образцов для каждого анализируемого полиморфизма с генотипами, подтвержденными испытываемым набором и методом пиросеквенирования (гомозигота СС, гетерозигота СТ,

гомозигота ТТ для rs1801133; гомозигота АА, гетерозигота АС, гомозигота СС для rs1801131), каждый образец был протестирован в 10 повторах.

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 разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Форма комплекта	Полиморфизм	Образцы	Повторяемость		Воспроизводимость	
			Количество образцов	Совпадение результатов с ожидаемыми, %	Количество образцов	Совпадение результатов с ожидаемыми, %
Форма 1	rs1801133	Гомозигота СС	10/10	100	20/20	100
		Гетерозигота СТ	10/10	100	20/20	100
		Гомозигота ТТ	10/10	100	20/20	100
	rs1801131	Гомозигота АА	10/10	100	20/20	100
		Гетерозигота АС	10/10	100	20/20	100
		Гомозигота СС	10/10	100	20/20	100
Форма 2	rs1801133	Гомозигота СС	10/10	100	20/20	100
		Гетерозигота СТ	10/10	100	20/20	100
		Гомозигота ТТ	10/10	100	20/20	100
	rs1801131	Гомозигота АА	10/10	100	20/20	100
		Гетерозигота АС	10/10	100	20/20	100
		Гомозигота СС	10/10	100	20/20	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 4

Результаты тестирования набора реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® MTHFR-SNP-FL и набора сравнения

Полиморфизм	Количество образцов	Генотип	Результаты применения АмплиСенс® MTHFR-SNP-FL	Результаты применения набора сравнения
rs1801133	100	Гомозигота CC	54	54
		Гетерозигота CT	36	36
		Гомозигота TT	10	10
rs1801131	100	Гомозигота AA	43	43
		Гетерозигота AC	45	45
		Гомозигота CC	12	12

Диагностические характеристики набора реагентов определяли на 100 образцах геномной ДНК человека. В качестве набора сравнения был использован набор реагентов для детекции генетических полиморфизмов методом пиросеквенирования с применением системы генетического анализа серии PyroMark «АмплиСенс® Пироскрин» (форма 7) (РУ № ФСР 2012/13246). При проведении тестирования расхождений между двумя методами выявлено не было.

Таблица 5

Диагностические характеристики набора реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® MTHFR-SNP-FL

Тип образцов	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %)		Диагностическая специфичность ² , (с доверительной вероятностью 95 %)	
	rs1801133	rs1801131	rs1801133	rs1801131
Цельная венозная кровь	100 % (69,1 – 100 %)	100 % (73,5 – 100 %)	100 % (96,0 – 100 %)	100 % (95,9 – 100 %)

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным набором сравнения.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным набором сравнения.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку³,

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

биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром⁴. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались

⁴ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор 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 соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

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

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Пробирки вакуумные для взятия, хранения и транспортировки проб крови для лабораторных исследований *in vitro* (например, Green Vac-Tube, Green Cross Medical Science Corporation, Корея), с ЭДТА в качестве антикоагулянта.
2. Иглы стерильные двусторонние трубчатые к вакуумным пробиркам для взятия венозной крови для лабораторных исследований *in vitro* (например, Green-Vac[®], Shina Corporation, («Шина Корпорейшн»), Корея).

Предварительная подготовка исследуемого материала

3. Реагент «ГЕМОЛИТИК» (РУ № ФСР 2010/09505) для предобработки цельной венозной крови.
4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 и/или 2,0 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
8. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
9. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
10. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
11. Холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
12. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
13. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

14. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) или другие, рекомендованные Изготовителем.
15. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.
16. Реагент ТЕ-буфер, пробирка 5 мл (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

17. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-50F:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) 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 (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
18. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
19. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл; 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
20. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
21. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
22. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
23. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 4 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и

- другие, рекомендованные Изготовителем).
24. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 25. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 26. Емкость для сброса наконечников.
 27. ПО для автоматической обработки результатов, зарегистрированное в установленном порядке.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служит цельная венозная кровь.

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

Допускается хранение образцов цельной венозной крови до проведения предобработки:

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

Недопустимо замораживание образцов цельной венозной крови!

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

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

В пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл внести 1,0 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 «РИБО-преп» добавить 300 мкл лизирующего раствора и в последующем экстрагировать ДНК в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «РИБО-преп», не добавляя лизирующий раствор повторно) или заморожен.

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

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

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Непригодными для исследования являются:

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

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (цельная венозная кровь), используемом для исследования. Для оценки влияния эндогенных веществ были протестированы образцы цельной венозной крови с известными генотипами, взятые в пробирки с 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 (см. табл. 6).

Таблица 6

Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация	Наличие интерференции
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

Для оценки влияния экзогенных веществ (антикоагулянтов) были протестированы образцы цельной венозной крови с известными генотипами, взятые в пробирки с гепарином и в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянтов (см. табл. 7).

Таблица 7

Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация ⁵	Наличие интерференции
Калий ЭДТА	до 2,0 мг/мл	Не обнаружено
Литий гепарин	от 12 МЕ/мл	Обнаружено

Для каждого из полиморфизмов исследовались образцы трех генотипов: СС, СТ и ТТ для полиморфизма А222V, С>Т (rs1801133); АА, АС и СС для полиморфизма Е429А, А>С (rs1801131). Каждый образец тестировался в трех повторах. Генотип образцов цельной венозной крови был подтвержден методом пиросеквенирования с применением системы генетического анализа серии PyroMark «АмплиСенс[®] Пироскрин» (форма 7) (РУ № ФСР 2012/13246).

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

⁵ 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.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «РИБО-преп» или другие, рекомендованные Изготовителем. Порядок работы с комплектом реагентов «РИБО-преп» смотрите в инструкции к соответствующему комплекту реагентов 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 ДНК человека, содержащих полиморфизмы A222V C>T (rs1801133) и E429A A>C (rs1801131) в гене MTHFR, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

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

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

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 $3 \cdot 10^5$ – $9 \cdot 10^5$ копий/мл) (для приготовления разведений рекомендуется использовать реагент ТЕ-буфер, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

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 MTHFR, 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 MTHFR, ПЦР-буфером-С и полимеразой (TaqF)**. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL MTHFR, ПЦР-буфером-С и полимеразой (TaqF)**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL MTHFR, 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 (К1+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ ДНК 1**.
- б) **положительный контроль ПЦР (К2+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ ДНК 2**.
- в) **положительный контроль ПЦР (К3+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ ДНК 3**.
- г) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.
- д) **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. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 8).

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Таблица 8

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного⁶ и планшетного⁷ типа

Цикл	Температура, °С	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, ROX, Cy5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе

⁶ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁷ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

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

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

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме, с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Анализ результатов амплификации проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам (см. табл. 9):

Таблица 9

Ген	rs	Канал для флуорофора			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
MTHFR	rs1801133	аллель С	аллель Т	-	-
	rs1801131	-	-	аллель А	аллель С

Результаты интерпретируются 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) в соответствующей графе таблицы результатов. Особенности установки пороговой линии для приборов планшетного и роторного типа приведены во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. Принцип интерпретации

результатов описан ниже.

Определение генотипа по полиморфизму A222V C>T (rs1801133) в гене MTHFR

1. Для каждого образца анализируются значения пороговых циклов (Ct) по каналам для флуорофоров FAM и JOE.
2. Если для исследуемого образца по каналу для флуорофора FAM определено значение Ct , которое меньше или равно граничному, а по каналу для флуорофора JOE значение Ct отсутствует или разница между значениями Ct по каналам для флуорофоров JOE и FAM (ΔCt (JOE/FAM)) больше граничной, то образец является **гомозиготой CC**.
3. Если для исследуемого образца по каналу для флуорофора JOE определено значение Ct , которое меньше или равно граничному, а по каналу для флуорофора FAM значение Ct отсутствует или разница между значениями Ct по каналам для флуорофоров FAM и JOE (ΔCt (FAM/JOE)) больше граничной, то образец является **гомозиготой TT**.
4. Если для исследуемого образца по каналам для флуорофоров FAM и JOE определено значение Ct , которое меньше или равно граничному, и разница значений Ct по модулю между каналами для флуорофоров FAM и JOE (ΔCt (FAM/JOE)) меньше граничной, то образец является **гетерозиготой CT**.
5. Если для исследуемого образца разница значений Ct по модулю между каналами для флуорофоров FAM и JOE (ΔCt (FAM/JOE)) превышает граничное значение для гетерозиготы и меньше граничного для гомозиготы, то результат анализа данного образца **невалиден**.
6. Если для исследуемого образца значение Ct по обоим каналам больше граничного, то результат анализа данного образца **невалиден**.

Определение генотипа по полиморфизму E429A A>C (rs1801131) в гене MTHFR

1. Для каждого образца анализируются значения пороговых циклов (Ct) по каналам для флуорофоров ROX и Cy5.
2. Если для исследуемого образца по каналу для флуорофора ROX определено значение Ct , которое меньше или равно граничному, а по каналу для флуорофора Cy5 значение Ct

- отсутствует или разница между значениями C_t по каналам для флуорофоров Cy5 и ROX (ΔC_t (Cy5/ROX)) больше граничной, то образец является **гомозиготой AA**.
3. Если для исследуемого образца по каналу для флуорофора Cy5 определено значение C_t , которое меньше или равно граничному, а по каналу для флуорофора ROX значение C_t отсутствует или разница между значениями C_t по каналам для флуорофоров ROX и Cy5 (ΔC_t (ROX/Cy5)) больше граничной, то образец является **гомозиготой CC**.
 4. Если для исследуемого образца по каналам для флуорофоров ROX и Cy5 определено значение C_t , которое меньше или равно граничному, и разница значений C_t по модулю между каналами для флуорофоров ROX и Cy5 (ΔC_t (ROX/Cy5)) меньше граничной, то образец является **гетерозиготой AC**.
 5. Если для исследуемого образца разница значений C_t по модулю между каналами для флуорофоров ROX и Cy5 (ΔC_t (ROX/Cy5)) превышает граничное значение для гетерозиготы и меньше граничного для гомозиготы, то результат анализа данного образца **невалиден**.
 6. Если для исследуемого образца значение C_t по обоим каналам больше граничного, то результат анализа данного образца **невалиден**.

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.

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

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)			
		FAM	JOE	ROX	Sy5
OK	Экстракция ДНК	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
K-	ПЦР	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
K1+	ПЦР	<u>Определено</u> меньше граничного	Отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров JOE и FAM больше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного	Отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров Sy5 и ROX больше граничного
K2+	ПЦР	Отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров FAM и JOE больше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного	Отсутствует или разница между значениями <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров ROX и Sy5 больше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного
K3+	ПЦР	<u>Определено</u> меньше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки

1. Для положительного контроля ПЦР (K1+ и/или K2+, и/или K3+) значение *Ct* не соответствует указанным в таблице 10 критериям. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Sy5 определено значение *Ct*. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.

3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5 определено значение *Ct*. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L – комплект реагентов для амплификации участков ДНК человека, содержащих полиморфизмы A222V C>T (rs1801133) и E429A A>C (rs1801131) в гене MTHFR, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь MTHFR-Lyo	Порошок белого цвета	-	48 пробирок объемом 0,2 мл
К+ ДНК 1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К+ ДНК 2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К+ ДНК 3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 48 реакций амплификации, включая контроли.

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 $1,2 \cdot 10^5$ – $3,6 \cdot 10^5$ копий/мл) (для приготовления разведений рекомендуется использовать реагент ТЕ-буфер, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью MTHFR-Lyo** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 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 (K1+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K+ ДНК 1** и **15 мкл K–**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (K2+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K+ ДНК 2** и **15 мкл K–**.
 - в) **положительный контроль ПЦР (K3+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K+ ДНК 3** и **15 мкл K–**.
 - г) **отрицательный контроль ПЦР (K–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл K–**.
 - д) **отрицательный контроль экстракции (OK)** – 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. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 11):

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов
роторного⁸ и планшетного⁹ типа**

Цикл	Температура, °С	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, ROX, Cy5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

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

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

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Анализ результатов амплификации проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для

⁸ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁹ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам (см. табл. 12):

Таблица 12

Ген	rs	Канал для флуорофора			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
MTHFR	rs1801133	аллель С	аллель Т	-	-
	rs1801131	-	-	аллель А	аллель С

Результаты интерпретируются 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) в соответствующей графе таблицы результатов. Особенности установки пороговой линии для приборов планшетного и роторного типа приведены во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. Принцип интерпретации результатов описан ниже.

Определение генотипа по полиморфизму **A222V C>T (rs1801133)** в гене **MTHFR**

1. Для каждого образца анализируются значения пороговых циклов (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и JOE.
2. Если для исследуемого образца по каналу для флуорофора FAM определено значение C_t , которое меньше или равно граничному, а по каналу для флуорофора JOE значение C_t отсутствует или разница между значениями C_t по каналам для флуорофоров JOE и FAM (ΔC_t (JOE/FAM)) больше граничной, то образец является **гомозиготой CC**.
3. Если для исследуемого образца по каналу для флуорофора JOE определено значение C_t , которое меньше или равно граничному, а по каналу для флуорофора FAM значение C_t отсутствует или разница между значениями C_t по каналам для флуорофоров FAM и JOE (ΔC_t (FAM/JOE)) больше граничной, то образец является **гомозиготой TT**.
4. Если для исследуемого образца по каналам для флуорофоров FAM и JOE определено значение C_t , которое меньше или равно граничному, и разница значений C_t по модулю между каналами для флуорофоров FAM и JOE (ΔC_t

(FAM/JOE)) меньше граничной, то образец является **гетерозиготой СТ**.

5. Если для исследуемого образца разница значений Ct по модулю между каналами для флуорофоров FAM и JOE (ΔCt (FAM/JOE)) превышает граничное значение для гетерозиготы и меньше граничного для гомозиготы, то результат анализа данного образца **невалиден**.
6. Если для исследуемого образца значение Ct по обоим каналам больше граничного, то результат анализа данного образца **невалиден**.

Определение генотипа по полиморфизму E429A A>C (rs1801131) в гене MTHFR

1. Для каждого образца анализируются значения пороговых циклов (Ct) по каналам для флуорофоров ROX и Cy5.
2. Если для исследуемого образца по каналу для флуорофора ROX определено значение Ct , которое меньше или равно граничному, а по каналу для флуорофора Cy5 значение Ct отсутствует или разница между значениями Ct по каналам для флуорофоров Cy5 и ROX (ΔCt (Cy5/ROX)) больше граничной, то образец является **гомозиготой AA**.
3. Если для исследуемого образца по каналу для флуорофора Cy5 определено значение Ct , которое меньше или равно граничному, а по каналу для флуорофора ROX значение Ct отсутствует или разница между значениями Ct по каналам для флуорофоров ROX и Cy5 (ΔCt (ROX/Cy5)) больше граничной, то образец является **гомозиготой CC**.
4. Если для исследуемого образца по каналам для флуорофоров ROX и Cy5 определено значение Ct , которое меньше или равно граничному, и разница значений Ct по модулю между каналами для флуорофоров ROX и Cy5 (ΔCt (ROX/Cy5)) меньше граничной, то образец является **гетерозиготой AC**.
5. Если для исследуемого образца разница значений Ct по модулю между каналами для флуорофоров ROX и Cy5 (ΔCt (ROX/Cy5)) превышает граничное значение для гетерозиготы и меньше граничного для гомозиготы, то результат анализа данного образца **невалиден**.

6. Если для исследуемого образца значение C_t по обоим каналам больше граничного, то результат анализа данного образца **невалиден**.

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. 13 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 13

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

Конт- роль	Контроли- руемый этап ПЦР-иссле- дования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)			
		FAM	JOE	ROX	Sy5
OK	Экстракция ДНК	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
K-	ПЦР	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
K1+	ПЦР	<u>Определено</u> меньше граничного	Отсутствует или разница между значениями C_t по каналам для флуорофоров JOE и FAM больше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного	Отсутствует или разница между значениями C_t по каналам для флуорофоров Sy5 и ROX больше граничного
K2+	ПЦР	Отсутствует или разница между значениями C_t по каналам для флуорофоров FAM и JOE больше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного	Отсутствует или разница между значениями C_t по каналам для флуорофоров ROX и Sy5 больше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного
K3+	ПЦР	<u>Определено</u> меньше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки

1. Для положительного контроля ПЦР (K1+ и/или K2+, и/или K3+) значение C_t не соответствует указанным в таблице 13 критериям. Необходимо повторить амплификацию и

детекцию для всех образцов.

2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5 определено значение *Ct*. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5 определено значение *Ct*. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-С, ПЦР-смеси-FL MTHFR и полимеразы (TaqF). ПЦР-буфер-С, ПЦР-смесь-FL MTHFR и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL MTHFR 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 MTHFR-Lyo хранить в пакетах 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: cs@pcr.ru¹⁰.

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

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ
«Поликлиника №1»
Управления делами Президента
Российской Федерации



Е.В. Ржевская

¹⁰ 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! Обратитесь к инструкции по применению
	Код партии		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Изготовитель		Дата изготовления
	Беречь от влаги		