«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«06» 06 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для дифференциального определения однонуклеотидных полиморфизмов
генов системы свертывания крови и фолатного цикла
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления

«РеалБест-Генетика Гемостаз (12)»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест-Генетика Гемостаз (12)» предназначен для дифференциального определения 12 однонуклеотидных полиморфизмов (*F2*:20210 G/A; *F5*:1691 G/A; *F7*:10976 G/A; *F13A1*:c.103 G/T; *FGB*:-455 G/A; *ITGA2*:807 C/T; *ITGB3*:1565 T/C; *PAI-1*:-675 5G/4G, *MTR*:2756 A/G; *MTRR*:66 A/G; *MTHFR*:677 C/T и *MTHFR*:1298 A/C) генов системы свертывания крови и фолатного цикла человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с последующим плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой и детекцией кривых плавления.

Набор предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами: «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Набор реагентов может быть применён в клинической практике для комплексного исследования генетических факторов, повышающих риск развития нарушений в системе свертывания крови и фолатном цикле. Результаты генетического тестирования в совокупности с наличием дополнительных средовых факторов риска могут дать основание врачу для назначения мер профилактики и терапии.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Выделение ДНК человека из клинических образцов (слюны, буккального эпителия, цельной крови, плазмы или сыворотки крови) осуществляется с помощью наборов «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100».

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Таким образом, для двух аллельных вариантов гена температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота) по каждому из определяемых полиморфизмов. Использование трех флуоресцентных красителей («FAM», «HEX», «ROX») позволяет определять генотип по трем полиморфизмам в одной пробирке.

Для анализа каждого образца используется 4 стрипированные пробирки с ГРС 1, 2, 3, 4, в каждой из которых осуществляется амплификация ДНК и детекция кривых плавления трех генетических полиморфизмов.

Таблица 1

Пробирка	**Анализ полиморфизма в генах**
ГРС1	*MTR, MTRR, MTHFR*
ГРС2	*MTHFR, FGB, PAI-1*
ГРС3	*F5, ITGB3, F7*
ГРС4	*ITGA2, F2, F13A1*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2.2. Состав набора:

– контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) – 1 пробирка (1,0 мл);

– контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) – 1 пробирка (1,0 мл);

– готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС 1, 2, 3, 4), лиофилизированная – 2 планшета по 96 пробирок;

– элюирующий раствор «Генетика» – 2 флакона (по 12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

– оптической плёнкой – 2,5 листа или стрипированными крышками.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения 12 однонуклеотидных полиморфизмов (*F2*:20210 G/A; *F5*:1691 G/A; *F7*:10976 G/A; *F13A1*:c.103 G/T; *FGB*:-455 G/A; *ITGA2*:807 C/T; *ITGB3*:1565 T/C; *PAI-1*:-675 5G/4G, *MTR*:2756 A/G; *MTRR*:66 A/G; *MTHFR*:677 C/T и *MTHFR:*1298 A/C) генов системы свертывания крови и фолатного цикла человека в соответствии с СОП 05-2-491 (аттестован ЗАО «Вектор-Бест») составляет 100%.

3.2. Контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) по всем полиморфизмам должен определяться как генотип «Нормальная гомозигота».

3.3. Контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) по всем полиморфизмам должен определяться как генотип «Мутантная гомозигота».

3.4. Диагностическая специфичность определения однонуклеотидных полиморфизмов генов системы свертывания крови и фолатного цикла человека: клинические испытания, проведенные на 370 образцах от 250 пациентов, показали 100% специфичность (интервал 99%-100%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

<u>Внимание!</u> Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

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

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

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

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

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

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

4.10. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:

«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ламинарный бокс II-го класса биологической защиты, предназначенный для работы с инфекционным материалом (фирма «Ламинарные системы», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма «Eppendorf», Германия);

– термошейкер (например, «Thermo Shaker TS-100» с блоком SC20N, фирма «BioSan», Латвия);

– встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» (например, «Bio-Vortex V-1 plus», фирма «BioSan», Латвия);

– дозаторы одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками (фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма «FinnTip», Финляндия);

– одноразовые наконечники для дозаторов (фирма «FinnTip», Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл, 2,0 мл и 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);

– магнитный штатив для пробирок на 2 мл (ЗАО «Вектор-Бест», Россия; или аналогичный);

– контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный);

– отсасыватель медицинский (В-40, «ВИСМА-ПЛАНАР», Россия);

– нож канцелярский.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа подготовить клинические образцы (слюны, буккального эпителия, цельной крови, плазмы или сыворотки крови) для исследования с помощью наборов для выделения ДНК «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100» в соответствии с инструкцией по применению набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора. КО1 и КО2 проходят процедуру выделения аналогично положительному контрольному образцу (см. Инструкцию набора для выделения).

Внимание! Элюцию образцов проводить в **200 мкл** элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить **400 мкл** элюирующего раствора «Генетика», входящего в состав данного набора.

Контрольные образцы после вскрытия флаконов хранить при температуре (2-8) °С в течение 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-60) °С до 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

7.1.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать нужное количество готовых реакционных смесей для ПЦР (одного планшета ГРС Гемостаз (12) достаточно для анализа 24 образцов) в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку и отрезать канцелярским ножом необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 КО1 и 1 КО2) пробирок с ГРС Гемостаз (12).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для анализа каждого образца (включая контрольные образцы) требуется 4 стрипированные пробирки с ГРС Гемостаз (12) (содержащие ГРС1, ГРС2, ГРС3, ГРС4). Пробирка с ГРС1 отмечена линией.

Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой.

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

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС составляет 3 месяца при температуре хранения (2-8) °С.

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с готовой реакционной смесью для ПЦР пронумеровать и расположить в штативе (см. стр. 7, рис 1).

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.3. В каждую из 4 пробирок стрипа пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой или закрыть стрипированными крышками.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК человека и регистрации кривых плавления.

При проведении анализа программирование амплификатора проводить в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией и пп. 7.6 – 7.9.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

для прибора «CFX96»:

— 1 стадия: 50 °С – 2 мин;

— 2 стадия: 95 °С – 2 мин;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 сек, 60 °С – 20 сек);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °С до 75 °С с шагом 1 °С

в течение 5 сек (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °С – 1 мин.

для прибора «ДТ-96»:

— 1 стадия: 50 °С – 2 мин;

— 2 стадия: 95 °С – 2 мин;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 сек, 60 °С – 20 сек);

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

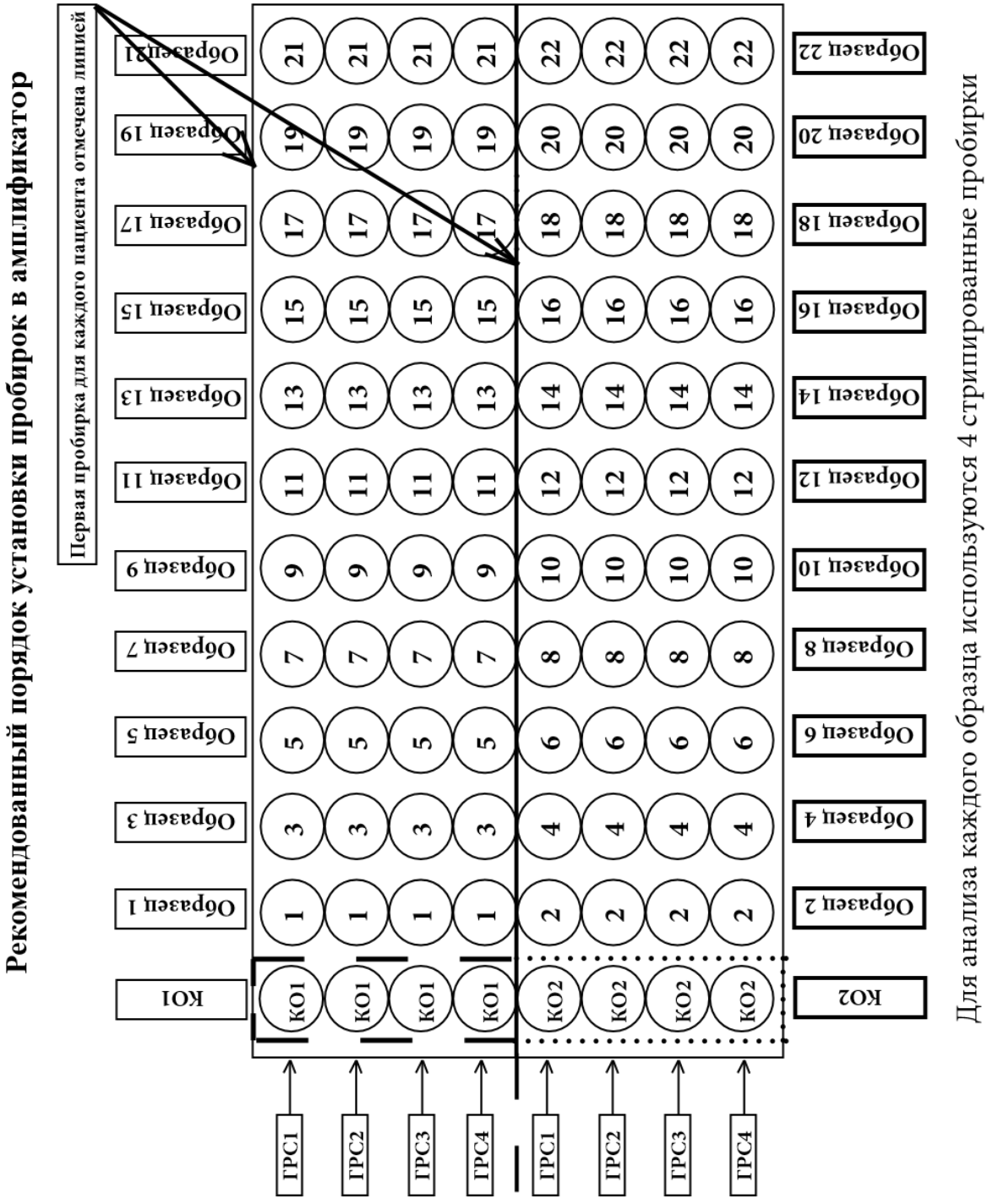
— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °С до 75 °С с шагом 1 °С

в течение 13 сек (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °С – хранение.

7.7. Выбрать каналы детекции «FAM», «HEX» и «ROX» кривых плавления дуплексов специфичного зонда и продукта амплификации для регистрации однонуклеотидных полиморфизмов.

Рисунок 1



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с дальнейшей регистрацией флуоресцентных сигналов кривых плавления.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Для контрольного образца КО1 в каждой ГРС 1-4 во всех каналах детекции «FAM», «HEX» и «ROX» программа должна фиксировать наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определять значение температуры плавления. КО1 должен определяться как генотип «Нормальная гомозигота» по всем 12 полиморфизмам.

8.2. Для контрольного образца КО2 в каждой ГРС 1-4 во всех каналах детекции «FAM», «HEX» и «ROX» программа должна фиксировать наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определять значение температуры плавления. КО2 должен определяться как генотип «Мутантная гомозигота» по всем 12 полиморфизмам.

8.3. Анализ результатов определения полиморфизмов в генах системы свертывания крови и фолатного цикла человека.

8.3.1. Для каждого исследуемого образца в ГРС 1-4 во всех каналах детекции «FAM», «HEX» и «ROX» должны фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться их температуры.

Внимание! Температуры плавления продуктов гибридизации могут отличаться не более чем на 2 °С от значений, полученных для КО1 и КО2.

Соответствие результатов анализа однонуклеотидным полиморфизмам представлено в таблице 2.

Таблица 2

Пробирка	**Канал детекции**					
	FAM		**HEX**		**ROX**	
	Ген	Полиморфизм	Ген	Полиморфизм	Ген	Полиморфизм
ГРС1	*MTR*	2756 A/G	*MTHFR*	1298 A/C	*MTRR*	66 A/G
ГРС2	*FGB*	-455G/A	*MTHFR*	677 C/T	*PAI-1*	-675 5G/4G
ГРС3	*F5*	1691 G/A	*ITGB3*	1565 T/C	*F7*	10976 G/A
ГРС4	*ITGA2*	807 C/T	*F2*	20210 G/A	*F13A1*	c.103 G/T

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.3.2. Определить генотип по каждому из 12 полиморфизмов в соответствии с полученными температурами пиков плавления для КО1 и КО2.

8.3.3. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2°С от значений, полученных для КО1 и КО2. В случае сомнительного результата необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

8.4. Диагностическая значимость определения однонуклеотидных полиморфизмов генов системы свертывания крови и фолатного цикла описана в литературе:

Lane D.A., Grant P.J. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease // Blood. 2000. Vol. 95. N. 5. P. 1517-1532.

Sykes T.C.F., Fegan C., Mosquera D. Thrombophilia, polymorphisms, and vascular disease // J. Clin. Pathol. 2000. Vol. 53. P. 300–306.

Rozalski M., Boncler M., Luzak B., Watala C. Genetic factors underlying differential blood platelet sensitivity to inhibitors // Pharmacological Reports. 2005. Vol. 57. P. 1-13.

Бицадзе В.О., Баймурадова С.М., Талалаева И.Н. Фолат-дефицитные состояния и уродства плода // Журнал РОАГ. 2008. №2. С. 42-48.

Цветовская Г.А., Чикова Е.Д., Лифшиц Г.И. и др. Генетические факторы риска тромбофилии у женщин репродуктивного возраста в Западно-Сибирском регионе // Фундаментальные исследования. 2010. № 10. С.72-79.

Щепотина Е.Г., Прасолова М.А., Иванов М.К. Новые наборы реагентов для выявления однонуклеотидных полиморфизмов генов фолатного цикла и системы свертывания крови // Новости Вектор-Бест. 2013. Т.68. №2. С. 2-8.

Полиморфизмы генов системы свёртывания крови:

Полиморфизм 20210 G/A гена F2 приводит к увеличению продукции протромбина, одного из ключевых белков, запускающего процесс свёртывания крови. Мутация наследуется по аутосомно-доминантному типу, т.е. тромбофилия возникает даже у гетерозиготного носителя изменённого гена (G/A). Наличие аллеля 20210A значительно (в 3 и более раз, а на фоне курения - в 40 и более раз) увеличивает риск возникновения венозных тромбозов, в том числе тромбозов сосудов мозга и сердца, особенно в молодом возрасте. У носителей генотипа G/A в 4-5 раз увеличивается риск раннего инфаркта миокарда (в возрасте до 45-50 лет). Также повышен риск развития тромбоэмболий после хирургических вмешательств и на фоне приёма оральных контрацептивов (относительный риск развития тром-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

бофилии и венозной тромбоэмболии у гетерозиготных носительниц полиморфизма 20210 G/A возрастает в 16 раз). Генотип G/A протромбина также является фактором риска развития осложнений при беременности (фетоплацентарная недостаточность, невынашивание беременности, внутриутробная гибель плода, токсикоз, задержка развития плода, отслойка плаценты).

Нуклеотидная замена 1691 G/A гена F5 («мутация Лейден») приводит к изменению структуры белка проакселерина (фактора 5 свёртывания крови), увеличивая стабильность его активной формы. Клинически это проявляется рецидивирующими венозными тромбозами и тромбоэмболиями. Наличие полиморфизма в гомозиготной или гетерозиготной форме значительно (в 3 и более раз, а на фоне заместительной гормонотерапии или приёма оральных контрацептивов - в 30 и более раз) увеличивает риск венозных тромбозов. Риск инфаркта миокарда увеличивается в 2 и более раз, риск развития патологии беременности (прерывание беременности, преэклампсия, хроническая плацентарная недостаточность и синдром задержки роста плода) увеличивается в 3 и более раз. Также, пациенты, являющиеся одновременно носителями полиморфизма 20210 G/A гена F2 протромбина и «мутации Лейден», ещё в большей степени подвержены риску развития тромбозов и тромбоэмболий.

Полиморфизм G10976A гена F7 как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состоянии приводит к понижению экспрессии гена и снижению уровня фактора VII в крови, рассматривается как протективный маркёр в отношении развития тромбозов и инфаркта миокарда.

Полиморфизм c.103G/T гена фибриназы F13A1 в гомо- и гетерозиготном состоянии снижает уровень фермента, участвующего в стабилизации фибринового сгустка и в формировании соединительной ткани. Это приводит к образованию сетчатой структуры фибрина с более тонкими волокнами, меньшими порами, и изменением характеристик проникновения, которое в сочетании с другими факторами риска ассоциируется с возможным риском внутричерепных кровоизлияний и кровотечений из внутренних органов, а также привычным невынашиванием беременности. При этом аллельный вариант F13A1:c.103T может выступать в роли протективного фактора в отношении инфаркта миокарда и венозных тромбозов.

Полиморфизм -455 G/A гена β-цепи фибриногена FGB обусловливает усиленную транскрипцию гена и может приводить к увеличению уровня фибриногена в крови и повышению вероятности образования тромбов при наличии дополнительных факторов рис-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ка. Гетерозиготный вариант -455G/A связывают с повышенным риском ишемического инсульта и лакунарными инфарктами церебральных сосудов. Гомозиготный вариант -455A/A связывают с повышенным риском инфаркта миокарда.

Полиморфизм 807C/T гена гликопротеина ITGA2 вызывает изменение структуры альфа-2-субъединицы интегринов – специализированных рецепторов тромбоцитов. При гетерозиготном носительстве отмечается увеличение скорости адгезии тромбоцитов к коллагену I типа, что может приводить к повышенному риску тромбофилии, инфаркта миокарда и других сердечно-сосудистых заболеваний. Аллельный вариант 807T связывают со случаями резистентности к аспирину. Помимо этого, при гомозиготном (807T/T) варианте значительно увеличивается количество рецепторов на поверхности тромбоцитов и значительно повышается риск тромбофилии, инфаркта миокарда и развития других острых эпизодов тромбообразования в возрасте до 50 лет, даже по сравнению с гетерозиготным вариантом.

Ген гликопротеина Gp3a ITGB3 кодирует синтез бета-3 цепи интегринового комплекса GP2b\3a, участвующего в разнообразных межклеточных взаимодействиях (адгезии и сигнализации). **Аллельный вариант 1565C** (гетерозигота 1565T/C и гомозигота 1565C/C) обусловливает повышенную адгезию тромбоцитов и может приводить к увеличению риска развития острого коронарного синдрома в возрасте до 50 лет, а также связан с синдромом привычного невынашивания беременности. У лиц с полиморфными аллельными вариантами часто отмечается пониженная эффективность аспирина.

Аллельный вариант -675 4G гена ингибитора активатора плазминогена PAI-1 сопровождается большей активностью гена, чем -675 5G, что обусловливает более высокую концентрацию PAI-1 и уменьшение активности противосвёртывающей системы. Преобладающим в популяции вариантом исследуемого полиморфизма является гетерозиготный вариант -675 5G/4G, обнаружение гетерозиготного генотипа самостоятельного диагностического значения не имеет, эффект возможно оценить только в сочетании с другими факторами предрасполагающими к развитию патологии (например в сочетании с FGB -455A). Гомозиготный генотип -675 4G/4G ассоциирован с повышением риска тромбообразования, преэклампсии, нарушением функции плаценты и самопроизвольного прерывания беременности.

Полиморфизмы генов фолатного цикла:

Метаболизм фолатов – важное звено первичного метаболизма клетки, он затрагивает такие жизненно важные клеточные процессы, как аминокислотный обмен, биосинтез нук-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

леотидов, метилирование ДНК и РНК. Нарушения метаболизма фолатов влияют на стабильность ДНК, могут участвовать в канцерогенезе, а также приводят к накоплению гомоцистеина в клетках и повышению его общего уровня в плазме крови. Высокая концентрация гомоцистеина оказывает прямое повреждающее действие на стенки сосудов, активирует систему свёртывания крови, агрегационную активность тромбоцитов, способствует повышению в крови содержания холестерина, способствует развитию атеросклероза, а также может быть причиной хронической невынашиваемости беременности, врождённой патологии плода, разного рода депрессивных состояний, старческой деменции, болезни Альцгеймера.

Наличие полиморфизмов генов фолатного цикла в гомозиготном состоянии приводит к снижению функциональной активности кодируемых этими генами ферментов (MTR, MTRR, MTHFR). При гетерозиготном носительстве мутантного аллеля, как правило, снижение активности незначительно. Влияние полиморфизмов усугубляется повышенным уровнем гомоцистеина ввиду сочетания нескольких полиморфизмов генов фолатного цикла или под действием факторов окружающей среды (дефицит фолиевой кислоты и витаминов B6 и B12, курение и др.).

Полиморфизм 2756A/G гена метионинсинтазы MTR (MTR:2756 A/G) приводит к торможению превращения гомоцистеина в метионин, накоплению гомоцистеина, что оказывает повреждающее действие на стенки сосудов и усиливает тромбообразование, повышению риска формирования пороков развития у плода. **Полиморфизм 66A/G гена метионинсинтазредуктазы MTRR** (*MTRR*:66 A/G) в гомозиготе проявляется в виде снижения активности фермента в 4 раза. Это приводит к увеличению уровня гомоцистеина и повышению риска развития дефектов нервной трубки у плода. Влияние полиморфизма усугубляется дефицитом витамина B12. При сочетании полиморфизма 66A/G гена MTRR с полиморфизмом 677C/T в гене MTHFR усиливается гипергомоцистеинемия и увеличивается риск врожденного порока развития нервной трубки. **Полиморфизм 677C/T гена метилтетрагидрофолатредуктазы MTHFR** при гомозиготном носительстве связан с четырьмя группами мультифакториальных заболеваний: сердечно-сосудистыми, дефектами развития плода, колоректальной аденомой и раком молочной железы и яичников. У женщин с генотипом 677T/T дефицит фолиевой кислоты во время беременности может приводить к порокам развития плода, в том числе незаращению нервной трубки. Неблагоприятное воздействие варианта 677T/T зависит от внешних факторов: низкого содержания в пище фолатов, курения, приема алкоголя. Сочетание генотипа 677T/T и папилломавирус-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ной инфекции увеличивает риск цервикальной дисплазии. Назначение препаратов фолиевой кислоты может значительно снизить негативное влияние данного варианта полиморфизма. **Полиморфизм MTHFR 1298A/C** вызывает снижение активности фермента, которое обычно не сопровождается изменением уровня гомоцистеина в плазме крови у носителей нормального аллеля полиморфизма 677C/T, однако сочетание аллельного варианта 1298C с аллелем 677T приводит к снижению уровня фолиевой кислоты и соответствует по своему эффекту гомозиготному состоянию MTHFR 677T/T. При этом риск развития дефектов нервной трубки повышается в 2 раза. Жизнеспособность плодов, имеющих одновременно оба полиморфных варианта, также снижена.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

По вопросам, касающимся качества набора **«РеалБест-Генетика Гемостаз (12)»**, следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу: 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«__» _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для дифференциального определения однонуклеотидных полиморфизмов
генов системы свертывания крови и фолатного цикла
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления

«РеалБест-Генетика Гемостаз (*F2/F5*)»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест-Генетика Гемостаз (*F2/F5*)» предназначен для дифференциального определения полиморфизмов 20210 G/A гена *F2* (фактор свертывания крови II, протромбин) и 1691 G/A (мутация Лейден) гена *F5* (фактор свертывания крови V, проакцелерин) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с последующим плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой и детекцией кривых плавления.

Набор предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами: «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Набор реагентов может быть применён в клинической практике для комплексного исследования генетических факторов, повышающих риск развития нарушений в системе свертывания крови. Результаты генетического тестирования в совокупности с наличием дополнительных средовых факторов риска могут дать основание врачу для назначения мер профилактики и терапии.

Выделение ДНК человека из клинических образцов (слюны, буккального эпителия,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

цельной крови, плазмы или сыворотки крови) осуществляется с помощью наборов «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100».

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Таким образом, для двух аллельных вариантов гена температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота) по каждому из определяемых полиморфизмов.

2.2. Состав набора:

– контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) – 1 пробирка (1,0 мл);

– контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) – 1 пробирка (1,0 мл);

– готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок);

– элюирующий раствор «Генетика» – 2 флакона (по 12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

– оптической плёнкой – 1 лист или стрипированными крышками.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения полиморфизмов *F2*:20210 G/A и *F5*:1691 G/A в соответствии с СОП 05-2-491 (аттестован ЗАО «Вектор-Бест») составляет 100%.

3.2. Контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) по всем полиморфизмам должен определяться как генотип «Нормальная гомозигота».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.3. Контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) по всем полиморфизмам должен определяться как генотип «Мутантная гомозигота».

3.4. Диагностическая специфичность определения однонуклеотидных полиморфизмов генов системы свертывания крови и фолатного цикла человека: клинические испытания, проведенные на 370 образцах от 250 пациентов, показали 100% специфичность (интервал 99%-100%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! ***Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.***

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

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

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

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

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

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

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

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4.10. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:

«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ламинарный бокс II-го класса биологической защиты, предназначенный для работы с инфекционным материалом (фирма «Ламинарные системы», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма «Eppendorf», Германия);

– термошейкер (например, «Thermo Shaker TS-100» с блоком SC20N, фирма «Bio-San», Латвия);

– встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» (например, «Bio-Vortex V-1 plus», фирма «BioSan», Латвия);

– дозаторы одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками (фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма «FinnTip», Финляндия);

– одноразовые наконечники для дозаторов (фирма «FinnTip», Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл, 2,0 мл и 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);

– магнитный штатив для пробирок на 2 мл (ЗАО «Вектор-Бест», Россия; или аналогичный);

– контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный);

– отсасыватель медицинский (В-40, «ВИСМА-ПЛАНАР», Россия);

– нож канцелярский.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для анализа подготовить клинические образцы (слюны, буккального эпителия, цельной крови, плазмы или сыворотки крови) для исследования с помощью наборов для выделения ДНК «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100» в соответствии с инструкцией по применению набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора. КО1 и КО2 проходят процедуру выделения аналогично положительному контрольному образцу (см. Инструкцию набора для выделения).

Внимание! Элюцию образцов проводить в **200 мкл** элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить **400 мкл** элюирующего раствора «Генетика», входящего в состав данного набора.

Контрольные образцы после вскрытия флаконов хранить при температуре температуру (2-8) °С в течение 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-60) °С до 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать готовую реакционную смесь для ПЦР (ГРС) в упаковке *(не вскрывая!)* при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку и отрезать канцелярским ножом необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 КО1 и 1 КО2) пробирок с ГРС.

Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой.

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

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС составляет 3 месяца при температуре хранения (2-8) °С.

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК человека и регистрации кривых плавления.

При проведении анализа программирование амплификатора проводить в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией и пп. 7.6. – 7.9.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

для прибора «CFX96»:

— 1 стадия: 50 °С – 2 мин;

— 2 стадия: 95 °С – 2 мин;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 сек, 60 °С – 20 сек);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °С до 75 °С с шагом 1 °С

в течение 5 сек (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °С – 1 мин.

для прибора «ДТ-96»:

— 1 стадия: 50 °С – 2 мин;

— 2 стадия: 95 °С – 2 мин;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 сек, 60 °С – 20 сек);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °С до 75 °С с шагом 1 °С

в течение 13 сек (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °С – хранение.

7.7. Выбрать каналы детекции «FAM» и «HEX» кривых плавления дуплексов специфичного зонда и продукта амплификации для регистрации однонуклеотидных полиморфизмов:

канал «HEX» – регистрация 20210 G/A гена *F2* (фактор свертывания крови II, протромбин);

канал «FAM» – регистрация 1691 G/A (мутация Лейден) гена *F5* (фактор свертывания крови V, проакцелерин).

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

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с дальнейшей регистрацией флуоресцентных сигналов кривых плавления.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Для контрольного образца КО1 по каналам «HEX» и «FAM» программа должна фиксировать наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота» и определять значение температуры плавления.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Программа должна определять КО1 как генотип «Нормальная гомозигота» по полиморфизмам 20210 G/A гена *F2* и 1691 G/A гена *F5*.

8.2. Для контрольного образца КО2 по каналам «HEX» и «FAM» программа должна фиксировать наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота» и определять значение температуры плавления.

Программа должна определять КО2 как генотип «Мутантная гомозигота» по полиморфизмам 20210 G/A гена *F2* и 1691 G/A гена *F5*.

8.3. Анализ результатов выявления полиморфизмов в генах *F2* и *F5*.

8.3.1. Для каждого исследуемого образца по каналам детекции «HEX» и «FAM» программа должна фиксировать один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определять их температуры.

Внимание! Температуры плавления продуктов гибридизации могут отличаться не более чем на 2°С от значений, полученных для КО1 и КО2.

По каналу «HEX» фиксируются кривые плавления дуплексов специфичного зонда и продукта амплификации для регистрации однонуклеотидного полиморфизма 20210 G/A гена *F2* (фактор свертывания крови II, протромбин).

По каналу «FAM» фиксируются кривые плавления дуплексов специфичного зонда и продукта амплификации для регистрации однонуклеотидного полиморфизма 1691 G/A (мутация Лейден) гена *F5* (фактор свертывания крови V, проакцелерин).

8.3.2. Для каждого образца определить генотип по полиморфизмам 20210 G/A гена *F2* и 1691 G/A (мутация Лейден) гена *F5* в соответствии с полученными температурами пиков плавления для КО1 и КО2.

8.4. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2°С от значений, полученных для **КО1 и КО2**. В случае сомнительного результата необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

8.5. Диагностическая значимость определения однонуклеотидных полиморфизмов генов системы свертывания крови и фолатного цикла описана в литературе:

Lane D.A., Grant P.J. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease // Blood. 2000. Vol. 95. N. 5. P. 1517-1532.

Sykes T.C.F., Fegan C., Mosquera D. Thrombophilia, polymorphisms, and vascular disease // J. Clin. Pathol. 2000. Vol. 53. P. 300–306.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Цветовская Г.А., Чикова Е.Д., Лифшиц Г.И. и др. Генетические факторы риска тромбофилии у женщин репродуктивного возраста в Западно-Сибирском регионе // Фундаментальные исследования. 2010. № 10. С.72-79.

Щепотина Е.Г., Прасолова М.А., Иванов М.К. Новые наборы реагентов для выявления однонуклеотидных полиморфизмов генов фолатного цикла и системы свертывания крови // Новости Вектор-Бест. 2013. Т.68. №2. С. 2-8.

Полиморфизм 20210 G/A гена F2 приводит к увеличению продукции протромбина, одного из ключевых белков, запускающего процесс свёртывания крови. Мутация наследуется по аутосомно-доминантному типу, т.е. тромбофилия возникает даже у гетерозиготного носителя измененного гена (G/A). Наличие аллеля 20210A значительно (в 3 и более раз, а на фоне курения - в 40 и более раз) увеличивает риск возникновения венозных тромбозов, в том числе тромбозов сосудов мозга и сердца, особенно в молодом возрасте. У носителей генотипа G/A в 4-5 раз увеличивается риск раннего инфаркта миокарда (в возрасте до 45-50 лет). Также повышен риск развития тромбоэмболий после хирургических вмешательств и на фоне приёма оральных контрацептивов (относительный риск развития тромбофилии и венозной тромбоэмболии у гетерозиготных носительниц полиморфизма 20210 G/A возрастает в 16 раз). Генотип G/A протромбина также является фактором риска развития осложнений при беременности (фетоплацентарная недостаточность, невынашивание беременности, внутриутробная гибель плода, токсикоз, задержка развития плода, отслойка плаценты).

Нуклеотидная замена 1691 G/A гена F5 («мутация Лейден») приводит к изменению структуры белка проакселерина (фактора 5 свёртывания крови), увеличивая стабильность его активной формы. Клинически это проявляется рецидивирующими венозными тромбозами и тромбоэмболиями. Наличие полиморфизма в гомозиготной или гетерозиготной форме значительно (в 3 и более раз, а на фоне заместительной гормонотерапии или приема оральных контрацептивов - в 30 и более раз) увеличивает риск венозных тромбозов. Риск инфаркта миокарда увеличивается в 2 и более раз, риск развития патологии беременности (прерывание беременности, преэклампсия, хроническая плацентарная недостаточность и синдром задержки роста плода) увеличивается в 3 и более раз. Также, пациенты, являющиеся одновременно носителями полиморфизма 20210 G/A гена F2 протром-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

бина и «мутации Лейден», еще в большей степени подвержены риску развития тромбозов и тромбоэмболий.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

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

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

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

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

По вопросам, касающимся качества набора **«РеалБест-Генетика Гемостаз (*F2/F5*)»**, следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«__» _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для дифференциального определения однонуклеотидных полиморфизмов
генов системы свертывания крови и фолатного цикла
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления

«РеалБест-Генетика Гемостаз (*MTR/MTRR/MTHFR*)»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест-Генетика Гемостаз (*MTR/MTRR/MTHFR*)» предназначен для дифференциального определения 4 однонуклеотидных полиморфизмов (*MTR*:2756 A/G; *MTRR*:66 A/G; *MTHFR*:677 C/T и *MTHFR*:1298 A/C) генов фолатного цикла человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с последующим плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой и детекцией кривых плавления.

Набор предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами: «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Набор реагентов может быть применён в клинической практике для комплексного исследования генетических факторов, повышающих риск развития нарушений в фолатном цикле. Результаты генетического тестирования в совокупности с наличием дополнительных средовых факторов риска могут дать основание врачу для назначения мер профилактики и терапии.

Выделение ДНК человека из клинических образцов (слюны, буккального эпителия, цельной крови, плазмы или сыворотки крови) осуществляется с помощью наборов «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100».

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Таким образом, для двух аллельных вариантов гена температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота) по каждому из определяемых полиморфизмов.

Для анализа каждого образца используется две готовые реакционные смеси ГРС1 и ГРС2, в каждой из которых осуществляется амплификация ДНК и детекция кривых плавления для определения двух генетических полиморфизмов.

Таблица 1

Пробирка	**Однонуклеотидный полиморфизм**
ГРС1	66 A/G гена *MTRR*, 1298 A/C гена *MTHFR*
ГРС2	2756 A/G гена *MTR*, 677 C/T гена *MTHFR*

2.2. Состав набора:

– контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) – 1 пробирка (1,0 мл);

– контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) – 1 пробирка (1,0 мл);

– готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС1), лиофилизированная – 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок);

– готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС2), лиофилизированная – 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок);

– элюирующий раствор «Генетика» – 2 флакона (по 12 мл).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Набор дополнительно комплектуется:

– оптической плёнкой – 1,5 листа или стрипированными крышками.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения 4 однонуклеотидных полиморфизмов (*MTR*:2756 A/G; *MTRR*:66 A/G; *MTHFR*:677 C/T и *MTHFR*:1298 A/C) генов фолатного цикла человека в соответствии с СОП 05-2-491 (аттестован ЗАО «Вектор-Бест») составляет 100%.

3.2. Контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) по всем полиморфизмам должен определяться как генотип «Нормальная гомозигота».

3.3. Контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) по всем полиморфизмам должен определяться как генотип «Мутантная гомозигота».

3.4. Диагностическая специфичность определения однонуклеотидных полиморфизмов генов системы свертывания крови и фолатного цикла человека: клинические испытания, проведенные на 370 образцах от 250 пациентов, показали 100% специфичность (интервал 99%-100%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

<u>Внимание!</u> Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

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

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

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

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

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

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

4.10. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:

«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ламинарный бокс II-го класса биологической защиты, предназначенный для работы с инфекционным материалом (фирма «Ламинарные системы», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма «Eppendorf», Германия);

– термошейкер (например, «Thermo Shaker TS-100» с блоком SC20N, фирма «BioSan», Латвия);

– встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» (например, «Bio-Vortex V-1 plus», фирма «BioSan», Латвия);

– дозаторы одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками (фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма «FinnTip», Финляндия);

– одноразовые наконечники для дозаторов (фирма «FinnTip», Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл, 2,0 мл и 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– магнитный штатив для пробирок на 2 мл (ЗАО «Вектор-Бест», Россия; или аналогичный);

– контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный);

– отсасыватель медицинский (В-40, «ВИСМА-ПЛАНАР», Россия);

– нож канцелярский.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа подготовить клинические образцы (слюны, буккального эпителия, цельной крови, плазмы или сыворотки крови) для исследования с помощью наборов для выделения ДНК «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100» в соответствии с инструкцией по применению набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора. КО1 и КО2 проходят процедуру выделения аналогично положительному контрольному образцу (см. Инструкцию набора для выделения).

Внимание! Элюцию образцов проводить в **200 мкл** элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить **400 мкл** элюирующего раствора «Генетика», входящего в состав данного набора.

Контрольные образцы после вскрытия флаконов хранить при температуре (2-8) °С в течение 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-60) °С до 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

7.1.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать готовую реакционную смесь для ПЦР с ГРС1 и ГРС2 в упаковках *(не вскрывая!)* при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку и отрезать канцелярским ножом необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 КО1 и 1 КО2) пробирок с ГРС1 и столько же пробирок с ГРС2.

Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой.

Внимание! *Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС1 и ГРС2 упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.*

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС1 и ГРС2 составляет 3 месяца при температуре хранения (2-8) °С.

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с ГРС1 и ГРС2 пронумеровать и расположить в штативе.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.3. В каждую пробирку с ГРС1 и ГРС2 пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой или закрыть стрипированными крышками.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК человека и регистрации кривых плавления.

При проведении анализа программирование амплификатора проводить в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией и пп. 7.6. – 7.9.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

для прибора «CFX96»:

— 1 стадия: 50°С – 2 мин;

— 2 стадия: 95°С – 2 мин;

— 3 стадия: 50 циклов (94°С – 10 сек, 60°С – 20 сек);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27°С до 75°С с шагом 1°С в течение 5 сек (измерение флуоресценции на каждом шаге);

— 5 стадия: 10°С – 1 мин.

для прибора «ДТ-96»:

— 1 стадия: 50 °С – 2 мин;

— 2 стадия: 95 °С – 2 мин;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 сек, 60 °С – 20 сек);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °С до 75 °С с шагом 1 °С

в течение 13 сек (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °С – хранение.

7.7. Выбрать каналы детекции «FAM», «HEX» и «ROX» кривых плавления дуплексов специфичного зонда и продукта амплификации для регистрации однонуклеотидных полиморфизмов.

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

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с дальнейшей регистрацией флуоресцентных сигналов кривых плавления.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Для контрольного образца КО1 в ГРС1 по каналам детекции «HEX» и «ROX» и в ГРС2 по каналам детекции «FAM» и «HEX» программа должна фиксировать наличие одного

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определять значение температуры плавления. Программа должна определять КО1 как генотип «Нормальная гомозигота» по всем четырем полиморфизмам.

8.2. Для контрольного образца КО2 в ГРС1 по каналам детекции «HEX» и «ROX» и в ГРС2 по каналам детекции «FAM» и «HEX» программа должна фиксировать наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определять значение температуры плавления. Программа должна определять КО2 как генотип «Мутантная гомозигота» по всем четырем полиморфизмам.

8.3. Анализ результатов выявления полиморфизмов в генах системы фолатного цикла человека.

8.3.1. Для каждого исследуемого образца в ГРС1 (каналы детекции «HEX» и «ROX») и ГРС2 (каналы детекции «FAM» и «HEX») программа должна фиксировать один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определять их температуры.

Внимание! Температуры плавления продуктов гибридизации могут отличаться не более чем на 2°С от значений, полученных для КО1 и КО2.

Соответствие результатов анализа однонуклеотидным полиморфизма представлено в таблице 2.

Таблица 2

Пробирка	**Канал детекции**					
	FAM		**HEX**		**ROX**	
	Ген	Полиморфизм	Ген	Полиморфизм	Ген	Полиморфизм
ГРС1	–		*MTHFR*	1298 A/C	*MTRR*	66 A/G
ГРС2	*MTR*	2756 A/G	*MTHFR*	677 C/T	–	

8.3.2. Для каждого образца определить генотип по полиморфизмам 66 A/G гена *MTRR*, 2756 A/G гена *MTR*, 1298 A/C и 677 C/T гена *MTHFR* в соответствии с полученными температурами пиков плавления для КО1 и КО2.

8.4. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2°С от значений, полученных для **КО1 и КО2**. В случае сомнительного результата необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

8.5. Диагностическая значимость определения однонуклеотидных полиморфизмов генов системы свертывания крови и фолатного цикла описана в литературе:

Sykes T.C.F., Fegan C., Mosquera D. Thrombophilia, polymorphisms, and vascular disease // J. Clin. Pathol. 2000. Vol. 53. P. 300–306.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Бицадзе В.О., Баймурадова С.М., Талалаева И.Н. Фолат-дефицитные состояния и уродства плода // Журнал РОАГ. 2008. №2. С. 42-48.

Цветовская Г.А., Чикова Е.Д., Лифшиц Г.И. и др. Генетические факторы риска тромбофилии у женщин репродуктивного возраста в Западно-Сибирском регионе // Фундаментальные исследования. 2010. № 10. С.72-79.

Щепотина Е.Г., Прасолова М.А., Иванов М.К. Новые наборы реагентов для выявления однонуклеотидных полиморфизмов генов фолатного цикла и системы свертывания крови // Новости Вектор-Бест. 2013. Т.68. №2. С. 2-8.

Полиморфизм 2756A/G гена MTR (*MTR*:2756 A/G) в гомозиготном состоянии вызывает изменение функциональной активности фермента метионин синтазы. Вследствие этого тормозится превращение гомоцистеина в метионин, происходит его накопление, что оказывает повреждающее действие на стенки сосудов и усиливает тромбообразование. Другое заметное проявление полиморфизма – повышение риска формирования пороков развития у плода. Влияние полиморфизма *MTR*:2756 A/G усугубляется повышенным уровнем гомоцистеина ввиду наличия других полиморфизмов генов фолатного цикла или под действием факторов окружающей среды (дефицит фолиевой кислоты и витаминов B6 и B12, курение и др.).

Полиморфизм 66A/G гена MTRR (*MTRR*:66 A/G) проявляется в виде изменения структуры фермента редуктазы метионинсинтазы, вызывающего снижение его активности (незначительно при гетерозиготном носительстве мутантного аллеля и примерно в 4 раза для гомозигот). Это приводит к увеличению уровня гомоцистеина и повышению риска развития дефектов нервной трубки у плода. Влияние полиморфизма усугубляется дефицитом витамина B12. При сочетании полиморфизма 66A/G гена MTRR с полиморфизмом 677C/T в гене MTHFR риск врожденного порока развития нервной трубки увеличивается. Полиморфизм 66A/G гена MTRR усиливает гипергомоцистеинемию, вызываемую полиморфизмом 677C/T в гене MTHFR.

Продуктом **гена MTHFR** (*MTHFR*:677 C/T и *MTHFR*:1298 A/C) является фермент метилентетрагидрофолатредуктаза, играющая ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты. **Полиморфизм 677C/T** гена MTHFR меняет структуру белка, снижая его функциональную активность, что начинает заметно проявляться при гомозиготном носительстве аллеля 677T. Данный полиморфизм связан с четырьмя группами мультифакториальных заболеваний: сердечно-сосудистыми, дефектами развития плода, колоректальной аденомой и раком молочной железы и яичников. У женщин с генотипом 677T/T дефицит

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

фолиевой кислоты во время беременности может приводить к порокам развития плода, в том числе незаращению нервной трубки. Неблагоприятное воздействие варианта 677T/T зависит от внешних факторов: низкого содержания в пище фолатов, курения, приема алкоголя. Сочетание генотипа 677T/T и папилломавирусной инфекции увеличивает риск цервикальной дисплазии. Назначение препаратов фолиевой кислоты может значительно снизить негативное влияние данного варианта полиморфизма.

Полиморфизм MTHFR 1298A/C меняет структуру белка в регулирующей области. При наличии данного полиморфизма отмечается снижение активности фермента MTHFR. Это снижение обычно не сопровождается изменением уровня гомоцистеина в плазме крови у носителей нормального аллеля полиморфизма 677C/T, однако сочетание аллельного варианта 1298C с аллелем 677T приводит к снижению уровня фолиевой кислоты и соответствует по своему эффекту гомозиготному состоянию MTHFR 677T/T. При этом риск развития дефектов нервной трубки повышается в 2 раза. Жизнеспособность плодов, имеющих одновременно оба полиморфных варианта, также снижена.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

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

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора **«РеалБест-Генетика Гемостаз (*MTR/MTRR/MTHFR*)»**, следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru