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

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для определения числа повторов (5TA/6TA/7TA/8TA) в гене *UGT1A1*
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления
«РеалБест-Генетика UGT1A1»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения числа повторов (5TA/6TA/7TA/8TA) в гене *UGT1A1* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «РеалБест-Генетика UGT1A1» (далее по тексту – набор) предназначен для качественного определения генотипа по полиморфизму динуклеотидного мотива тимин-аденин (TA) в промоторной области гена уридиндифосфат-глюкуронозилтрансферазы 1 (UGT1A1), ассоциированному с риском развития синдрома Жильбера, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой с последующим анализом кривых плавления. Набор может быть использован для дифференциальной диагностики синдрома Жильбера при пигментных гепатозах в совокупности с данными клинического анамнеза и выявлением характерных биохимических маркеров, таких как повышенный уровень билирубина.

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

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

ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичных ДНК-зондов, содержащих флуоресцентный краситель, с продуктом амплификации (ампликоном) и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся комплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель, при этом детектируется рост флуоресцентного сигнала. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления комплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности.

Промоторная область гена *UGT1A1* содержит полиморфный фрагмент, для которого, кроме нормального варианта нуклеотидной последовательности $A(TA)_6TAA$, встречаются варианты аллелей с делециями или инсерциями: rs3064744 dupTA или $A(TA)_7TAA$, dupTATA или $A(TA)_8TAA$, delTA или $A(TA)_5TAA$. Данные аллельные варианты, отличающиеся по длине нуклеотидной последовательности и по функциональной активности промотора, для краткости часто обозначают цифрой по числу TA-повторов в скобках в обозначении выше. Далее по тексту соответствующие аллели обозначены «5TA», «6TA» (популяционная норма), «7TA» и «8TA», а полиморфизм rs3064744 обозначен как «5TA/6TA/7TA/8TA»). Набор реагентов «РеалБест-Генетика UGT1A1» выявляет четыре варианта аллелей и позволяет определить генотип анализируемого образца по полиморфизму TA-повторов.

В ГРС1 присутствуют два ДНК-зонда. ДНК-зонд с флуорофором «FAM» соответствует по нуклеотидной последовательности аллелю «7TA». В случае присутствия аллеля «7TA» в образце фиксируется высокое значение температуры плавления (Tm) комплекса ампликон-зонд в канале «FAM». С аллелями «5TA», «6TA» и «8TA» ДНК-зонд имеет несоответствия, в этом случае фиксируется температура плавления ниже, чем для аллеля «7TA». Таким образом, по каналу «FAM» в ГРС1 можно получить два варианта результатов: 1) есть аллель «7TA» в гомозиготном или гетерозиготном состоянии; 2) нет аллеля «7TA», но присутствуют аллели «6TA», «5TA» или «8TA».

ДНК-зонд с флуорофором «HEX» в ГРС1 соответствует аллелю «6TA» (популяционная норма). В случае присутствия аллеля «6TA» в образце фиксируется высокое значение температуры плавления комплекса ампликон-зонд в канале «HEX». Варианты мутантных аллелей («5TA», «7TA» и «8TA») отличаются от зонда «HEX» и, соответственно, комплекс ДНК-зонда с ними имеет меньшее значение температуры плавления. Таким образом, по каналу «HEX» в ГРС1 можно получить два варианта результатов: 1) есть аллель «6TA» в гомозиготном или гетерозиготном состоянии; 2) нет аллеля «6TA», но присутствуют аллели «7TA», «5TA» или «8TA».

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

В ГРС2 также присутствуют два ДНК-зонда, соответствующие аллелям «8ТА» (зонд с «FAM») и «5ТА» (зонд с «HEX»). Для аллеля «8ТА» фиксируется только пик с высокой температурой плавления в канале «FAM», для аллеля «5ТА» – только пик с высокой температурой плавления в канале «HEX», для аллелей «6ТА» и «7ТА» пики в каналах «FAM» и «HEX» имеют низкую температуру плавления, либо не детектируются. Таким образом, по результатам анализа по каналу «FAM» в ГРС2 можно различить варианты: 1) есть аллель «8ТА», 2) нет аллеля «8ТА»; по каналу «HEX» в ГРС2: 1) есть аллель «5ТА», 2) нет аллеля «5ТА».

Итоговый генотип определяется комбинацией результатов по каналам «FAM» и «HEX» в ГРС1 и ГРС2.

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) *Описание.*	**Количество**
Контрольный образец «Гомозигота 6ТА» (КО1) *Лиофилизированный*	1 фл.
Контрольный образец «Гомозигота 7ТА» (КО2) *Лиофилизированный*	1 фл.
Контрольный образец «Гомозигота 8ТА» (КО3) *Лиофилизированный*	1 фл.
Контрольный образец «Гомозигота 5ТА» (КО4) *Лиофилизированный*	1 фл.
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС1) *Лиофилизированная*	48 пробирок
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС2) *Лиофилизированная*	48 пробирок
Элюирующий раствор «Генетика» *Бесцветная жидкость*	2 фл., по 12 мл
Раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) *Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)*	1 фл., 4 мл
Оптическая пленка	2 листа
Пластиковые крышки	4 шт.

2.3. Условия применения.

Аналитические и диагностические характеристики набора были валидированы при выделении ДНК из клинического материала (цельной крови, буккального эпителия) с использованием наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100», позволяющих получить концентрацию ДНК человека не менее 250 копий на реакционную пробирку (на 50 мкл препарата выделенной ДНК).

Набор применяется с регистрирующим амплификатором «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США).

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

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность набора «РеалБест-Генетика UGT1A1» по стандартному образцу предприятия (СОП 05-2-810), содержащему образцы с известными генотипами по полиморфизму (5TA/6TA/7TA/8TA) в промоторной области гена *UGT1A1,* определенными методом секвенирования по Сэнгеру, составляет 100 %.

3.2. Аналитическая чувствительность – минимальное количество ДНК человека, достаточное для получения валидного результата анализа, – 250 копий на реакционную пробирку (на 50 мкл препарата выделенной ДНК).

3.3. Аналитическая специфичность – для оценки аналитической специфичности был проведен in silico анализ последовательностей праймеров и зондов по базам последовательностей вирусов и микроорганизмов, в том числе микроорганизмов, которые могут присутствовать в ротовой полости (Staphylococcus spp, Streptococcus spp, Prevotella spp, Leptotrichia spp, Corynebacterium spp, Neisseria spp). Возможность перекрестных реакций исключена.

3.4. Диагностическая чувствительность:

- в отношении **аллеля 6TA** диагностическая чувствительность, вычисляемая как процент правильно определённых генотипов для образцов, содержащих один или два аллеля 6TA гена UGT1A1, в клинических испытаниях, проведённых на образцах от 87 пациентов, составила 100% (интервал 95,9 - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- в отношении **аллеля 7TA** диагностическая чувствительность, вычисляемая как процент правильно определённых генотипов для образцов, содержащих один или два аллеля 7TA гена UGT1A1, в клинических испытаниях, проведённых на образцах от 195 пациентов, составила 100% (интервал 98,1 - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- в отношении **аллеля 8TA** диагностическая чувствительность, вычисляемая как процент правильно определённых генотипов для образцов, содержащих аллель 8TA гена UGT1A1, в клинических испытаниях, проведённых на образцах от 6 пациентов, составила 100% (интервал 54,1 - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- в отношении **аллеля 5TA** диагностическая чувствительность, вычисляемая как процент правильно определённых генотипов для образцов, содержащих аллель 5TA гена UGT1A1, в клинических испытаниях, проведённых на образцах от 6 пациентов, составила 100% (интервал 54,1 - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.5. Диагностическая специфичность:

- в отношении **аллеля 6TA** диагностическая специфичность, вычисляемая как процент правильно определённых генотипов для образцов, не содержащих аллеля 6TA в гене UGT1A1, в клинических испытаниях, проведённых на образцах от 150 пациентов, составила 100% (интервал 97,6 - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

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

- в отношении **аллеля 7ТА** диагностическая специфичность, вычисляемая как процент правильно определённых генотипов для образцов, не содержащих аллеля 7ТА в гене UGT1A1, в клинических испытаниях, проведённых на образцах от 42 пациентов, составила 100% (интервал 91,6 - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- в отношении **аллеля 8ТА** диагностическая специфичность, вычисляемая как процент правильно определённых генотипов для образцов, не содержащих аллеля 8ТА в гене UGT1A1, в клинических испытаниях, проведённых на образцах от 231 пациентов, составила 100% (интервал 98,4 - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- в отношении **аллеля 5ТА** диагностическая специфичность, вычисляемая как процент правильно определённых генотипов для образцов, не содержащих аллеля 5ТА в гене UGT1A1, в клинических испытаниях, проведённых на образцах от 231 пациентов, составила 100% (интервал 98,4 - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.6. Воспроизводимость результатов качественного определения генотипа (5ТА/6ТА/7ТА/8ТА): клинические испытания, проведенные на образцах от 237 пациентов с использованием двух серий набора реагентов, показали 100 % межсерийную воспроизводимость результатов. При тестировании в двух независимых постановках двумя разными операторами на двух сериях набора образцов с разными генотипами в 10 повторах каждый внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость результатов составила 100 %.

3.7. В клинических испытаниях показано отсутствие влияния потенциально интерферирующих веществ: гемоглобина до 209 г/л, билирубина до 0,2 мг/мл (350 мкмоль/л), триглицеридов до 30 мг/мл, альбумина до 90 мг/мл - в образцах крови; муцина до 2 %, крови до 5% - в образцах буккального эпителия, при использовании для выделения ДНК наборов реагентов «РеалБест Экстракция 100» и «РеалБест-Генетика экспресс».

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (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». Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

4.3. РВК содержит натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабора-

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

торий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

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

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

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

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (*такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова», 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»*).

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

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией флуоресценции в режиме реального времени «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США);

– ламинарный бокс II класса биологической защиты (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы», Россия);

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

– мини-шейкер, обеспечивающий перемешивание реагентов в планшетах с частотой 1200 об/мин (например, PSU-2T, фирма «BioSan», Латвия);

– микроцентрифуга для пробирок вместимостью 2 мл, обеспечивающая 13000 об/мин (например, «Eppendorf MiniSpin», фирма «Eppendorf», Германия);

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

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

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

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

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, фирма «Sartorius», Германия);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма SSI, США);

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

– нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Для анализа подготовить клинические образцы (буккального эпителия, цельной крови) с помощью наборов для выделения ДНК.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1, КО2, КО3 и КО4, которые являются компонентами данного набора.

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

Выделение ДНК из образцов цельной крови и буккального эпителия проводить согласно инструкции по применению набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Допускается использование образцов как свежей, так и перемороженной цельной крови с любой степенью гемолиза при соблюдении временно-температурных условий хранения и транспортировки материала, указанных в инструкции по применению набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс». В качестве антикоагулянта рекомендуется использование солей ЭДТА, не допускается использование гепаринизированной крови.

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

Элюцию образцов проводить элюирующим раствором «Генетика», который является компонентом данного набора.

После вскрытия флакона элюирующий раствор «Генетика» хранить при температуре

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

(2-8) °С не более 3 месяцев.

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

Подготовку образцов буккального эпителия необходимо проводить в соответствии с п. 6.7 инструкции по применению набора «РеалБест экстракция 100» (Подготовка образцов соскобов эпителиальных клеток)

При выделении ДНК из образцов цельной крови, необходимо провести их предварительную обработку с использованием набора реагентов «РеалБест Гемолитик». Предварительной обработке подвергается цельная кровь объемом 50 мкл согласно инструкции по применению набора. Условия использования образцов цельной крови при применении набора реагентов «РеалБест Гемолитик» совпадают с условиями, описанными выше для использования набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

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

Выделение ДНК из образцов проводить в соответствии с инструкцией по применению набора «РеалБест экстракция 100», но без внесения в каждую пробирку раствора ВКО и без использования ОКО. КО1, КО2, КО3 и КО4 проходят процедуру выделения ДНК, описанную для ПКО.

Элюцию образцов проводить в 200 мкл элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. После окончания инкубации на термошейкере коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок и добавить в каждую пробирку 400 мкл элюирующего раствора «Генетика», входящего в состав данного набора. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту.

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

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

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника и выдержать компоненты набора (не вскрывая!) при температуре (18−26) °С не менее 30 минут.

6.2.2. Вскрыть флаконы с КО1, КО2, КО3 и КО4, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятые крышки и пробки поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Добавить 500 мкл РВК, плотно закрыть флакон новой пластиковой крышкой, входящей в состав набора. Аккуратно перемешать, выдержать при температуре (18−26) °С 15 минут, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения КО1, КО2, КО3 и КО4 хранить при температуре (2-8) °С не более

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

1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

После вскрытия флакона РВК хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

6.2.3. Вскрыть упаковки с ГРС1 и ГРС2, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество пробирок ГРС1 и ГРС2 (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: по 1 шт. для КО1 и КО2 для ГРС1; по 1 шт. для КО3 и КО4 для ГРС2). Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

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

После первого вскрытия упаковки ГРС1 и ГРС2 хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество пробирок с ГРС1 и ГРС2 пронумеровать и расположить в штативе.

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

7.2. В каждую пробирку с ГРС1 и ГРС2 дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Контрольные образцы, прошедшие процедуру выделения ДНК, внести дозатором с отдельным наконечником с фильтром по 50 мкл: КО1 и КО2 в ГРС1, КО3 и КО4 в ГРС2.

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

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

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК с последующим плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой и детекцией кривых плавления в соответствии с инструкцией к прибору.

Протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

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

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

5 стадия: 10 °С – 1 минута.

7.6. Выбрать каналы «FAM» и «HEX» для детекции кривых плавления комплексов

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

специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации.

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

7.8. Запустить программу и провести реакцию амплификации с последующим плавлением и регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

Для КО1 в каждом из каналов детекции «FAM» и «HEX» в ГРС1 должно фиксироваться наличие одного пика плавления и определяться значение температуры плавления.

Для КО2 в каждом из каналов детекции «FAM» и «HEX» в ГРС1 должно фиксироваться наличие одного пика плавления и определяться значение температуры плавления.

Для КО3 в канале детекции «FAM» в ГРС2 должно фиксироваться наличие одного пика плавления и определяться значение температуры плавления.

Для КО4 в канале детекции «HEX» в ГРС2 должно фиксироваться наличие одного пика плавления и определяться значение температуры плавления.

8.2. Анализ результатов определения генотипа по числу ТА-повторов в промоторной области гена *UGT1A1*.

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в ГРС1 в каждом из каналов детекции «FAM» и «HEX» должны фиксироваться один или два пика плавления и определяться значения температур плавления. В ГРС2 для каждого исследуемого образца должен фиксироваться пик плавления в одном или в обоих каналах детекции «FAM» и «HEX» и определяться значение температуры плавления.

8.2.2. Анализ результатов по каналу детекции «FAM» в ГРС1.

8.2.2.1. При определении одного пика плавления со значением температуры (Tm КО2 ± 2) °С генотип анализируемого образца включает один или два аллеля «7ТА».

8.2.2.2. При определении одного пика плавления со значением температуры менее (Tm КО2 - 2) °С в анализируемом образце аллель «7ТА» отсутствует.

8.2.2.3. При определении двух пиков плавления возможны разные варианты генотипов, для уточнения сверьтесь со значениями, указанными в Таблице 1.

8.2.3. Анализ результатов по каналу детекции «HEX» в ГРС1.

8.2.3.1. При определении одного пика плавления со значением температуры (Tm КО1 ± 2) °С генотип анализируемого образца включает один или два аллеля «6ТА».

8.2.3.2. При определении одного пика плавления со значением температуры (Tm КО2 ± 2) °С в анализируемом образце аллель «6ТА» отсутствует.

8.2.3.3. При определении двух пиков плавления возможны разные варианты генотипов,

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

для уточнения сверьтесь со значениями, указанными в Таблице 1.

8.2.4. Анализ результатов по каналу детекции «FAM» в ГРС2.

8.2.4.1. При определении одного пика плавления со значением температуры (Tm КО3 ± 2) °С генотип анализируемого образца включает один или два аллеля «8ТА».

8.2.4.2. При определении одного пика плавления со значением температуры менее (Tm КО3 - 2) °С в анализируемом образце аллель «8ТА» отсутствует.

8.2.4.3. При определении двух пиков плавления учитывать следует только один пик, более «глубокий» (соответствующий наименьшему значению -d(RFU)/dT на графике), и интерпретировать результаты в соответствии с пп. 8.2.4.1.-8.2.4.2.

8.2.4.4. Если пик плавления не детектируется, анализируемый образец имеет генотип «5ТА/5ТА» (при условии, что это согласуется с другими показателями, приведенными в соответствующей строке Таблицы 1).

8.2.5. Анализ результатов по каналу детекции «HEX» в ГРС2.

8.2.5.1. При определении одного пика плавления со значением температуры (Tm КО4 ± 2) °С генотип анализируемого образца включает один или два аллеля «5ТА».

8.2.5.2. При определении одного пика плавления со значением температуры менее (Tm КО4 - 2) °С, либо если пик плавления не детектируется, в анализируемом образце аллель «5ТА» отсутствует.

8.2.5.3. При определении двух пиков плавления учитывать следует только один пик, более «глубокий» (соответствующий наименьшему значению -d(RFU)/dT на графике), и интерпретировать результаты в соответствии с пп. 8.2.5.1-8.2.5.2.

8.2.6. Анализ итогового генотипа по полиморфизму 5ТА/6ТА/7ТА/8ТА гена *UGT1A1*.

Определить итоговый генотип по полиморфизму 5ТА/6ТА/7ТА/8ТА гена *UGT1A1* для каждого образца с учётом результатов анализа по каждому из каналов детекции в ГРС1 и ГРС2 суммарно на основании пп. 8.2.2 - 8.2.5. и данных Таблицы 1.

Таблица 1.

Определение генотипа анализируемого образца по полиморфизму 5ТА/6ТА/7ТА/8ТА гена *UGT1A1**

Генотип	**ГРС 1 FAM**	**ГРС 1 HEX**	**ГРС 2 FAM**	**ГРС 2 HEX**
6ТА/6ТА	Tm = ($Tm_{КО1}$ ± 2) или 2 пика Tm1 = ($Tm_{КО1}$ ± 2); Tm2 = ($Tm_{КО2}$ ± 2)	Tm = ($Tm_{КО1}$ ± 2)	Tm < ($Tm_{КО3}$ - 2)	Tm < ($Tm_{КО4}$ - 2) или не определяется
6ТА/7ТА	Tm = ($Tm_{КО2}$ ± 2)	Tm = ($Tm_{КО1}$ ± 2)	Tm < ($Tm_{КО3}$ - 2)	Tm < ($Tm_{КО4}$ - 2) или не определяется

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

7TA/7TA	Tm = (Tm $_{КО2}$ ± 2)	Tm = (Tm $_{КО2}$ ± 2) или 2 пика Tm1 = (Tm $_{КО1}$ ± 2); Tm2 = (Tm $_{КО2}$ ± 2)	Tm < (Tm $_{КО3}$ - 2)	Tm < (Tm $_{КО4}$ - 2) или не определяется
5TA/6TA	Tm ≤ Tm $_{КО1}$ или 2 пика Tm1 ≤ Tm $_{КО1}$; Tm2 = (Tm $_{КО2}$ ± 2);	Tm = (Tm $_{КО1}$ ± 2) или 2 пика Tm1 = (Tm $_{КО1}$ ± 2); Tm2 = (Tm $_{КО2}$ ± 2)	Tm < (Tm $_{КО3}$ - 2)	Tm = (Tm $_{КО4}$ ± 2)
5TA/7TA	Tm = (Tm $_{КО2}$ ± 2) или 2 пика Tm1 = (Tm $_{КО2}$ ± 2); Tm2 ≤ Tm $_{КО1}$	Tm = (Tm $_{КО2}$ ± 2)	Tm < (Tm $_{КО3}$ - 2)	Tm = (Tm $_{КО4}$ ± 2)
6TA/8TA	Tm $_{КО1}$ < Tm < (Tm $_{КО2}$ - 2)	Tm = (Tm $_{КО1}$ ± 2) или 2 пика Tm1 = (Tm $_{КО1}$ ± 2); Tm2 ≤ Tm $_{КО2}$	Tm = (Tm $_{КО3}$ ± 2)	Tm < (Tm $_{КО4}$ - 2) или не определяется
7TA/8TA	Tm = (Tm $_{КО2}$ ± 2)	Tm = (Tm $_{КО2}$ ± 2) или 2 пика Tm1 = (Tm $_{КО1}$ ± 2); Tm2 = (Tm $_{КО2}$ ± 2)	Tm = (Tm $_{КО3}$ ± 2)	Tm < (Tm $_{КО4}$ - 2) или не определяется
5TA/5TA	Tm ≤ Tm $_{КО1}$	Tm = (Tm $_{КО2}$ ± 2)	не определяется	Tm = (Tm $_{КО4}$ ± 2)
8TA/8TA	Tm $_{КО1}$ < Tm < (Tm $_{КО2}$ - 2)	Tm ≤ Tm $_{КО2}$	Tm = (Tm $_{КО3}$ ± 2)	не определяется
5TA/8TA	Tm $_{КО1}$ < Tm < (Tm $_{КО2}$ - 2)	Tm = (Tm $_{КО2}$ ± 2)	Tm = (Tm $_{КО3}$ ± 2)	Tm = (Tm $_{КО4}$ ± 2)

*учитывая низкую частоту встречаемости аллелей «5TA» и «8TA», обнаружение генотипов «5TA/5TA», «5TA/8TA» и «8TA/8TA» крайне маловероятно. В таблице приведены расчётные значения температур плавления для этих генотипов.

8.3. Результат генотипирования образца считается сомнительным, если не выполнено хотя бы одно из условий п. 8.2. или полученная комбинация значений температур по четырём каналам детекции отсутствует в Таблице 1. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту. В случае сомнительного результата необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

Сомнительный результат может быть вызван слишком низкой концентрацией геномной ДНК в реакционной смеси (вследствие неправильного забора материала, ошибок при пробоподготовке). Для надёжности получения результата генотипирования полиморфизма гена UGT1A1 перед анализом рекомендуется проводить проверку качества выделенной ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест Валидация образца», выявляющего фрагмент аутосомного уникального гена человека HMBS. Если для анализируемого образца значение Ct ДНК гена HMBS по каналу «ROX» больше 33 или не определяется (то есть содержание в реакционной смеси копий (геном-эквивалентов) ДНК гена *HMBS* менее 250), то это свидетельствует о недостаточном количестве ДНК в выделенном образце. Необходимо провести повторный забор для исследования образца буккального эпителия или провести повторный анализ образца цельной крови, начиная с этапа выделения ДНК.

8.4. Диагностическая значимость

Ген *UGT1A1* кодирует фермент биотрансформации ксенобиотиков уридиндифосфат-

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

глюкуронозилтрансферазу, который осуществляет реакцию конъюгирования различных соединений с глюкуроновой кислотой. В промоторе гена *UGT1A1* находится область ТА-повторов, для которой характерен полиморфизм. Количество ТА-повторов варьирует от 5 до 8. Нормальный аллель содержит 6 ТА-повторов. Наиболее часто встречается дефектный аллель, содержащий 7 ТА-повторов (частота встречаемости у европеоидов составляет 35-40 %) и проявляющийся снижением активности промотора *UGT1A1*. Также описан аллель, содержащий 5 ТА-повторов и проявляющийся повышением активности промотора *UGT1A1*, и аллель, содержащий 8 ТА-повторов, проявляющийся снижением активности промотора. Согласно данным литературы, аллели, содержащие 5 ТА-повторов и 8 ТА-повторов, характерны для афроамериканцев (3,5 % и 7-8 %, соответственно), а среди европеоидов встречаются с частотой менее 1 %.

Синдром Жильбера - довольно распространённое (5-7 % среди европеоидов) метаболическое состояние, для которого характерно повышение билирубина в плазме крови на 30-40 % с преобладанием непрямой фракции и нормальными показателями других печеночных проб. Одной из причин накопления непрямого билирубина могут являться генетические дефекты в промоторе гена *UGT1A1*, приводящие к нарушению функциональной активности фермента *UGT1A1*.

Поскольку *UGT1A1* участвует в глюкуронидации ряда лекарственных препаратов, возможно развитие токсических реакций на препарат, и зачастую при лекарственной терапии происходит манифестация синдрома Жильбера.

Для определения метаболического статуса пациента важно выявление всех аллелей, так как их сочетание определяет общую активность фермента *UGT1A1*. Клиническая значимость генотипирования промоторной области *UGT1A1* заключается не только в подтверждении диагноза «синдром Жильбера» как такового, но и позволяет сделать прогноз об эффективности терапии лекарственными препаратами, и развитии нежелательных лекарственных реакций при их приеме.

Более подробно ознакомиться с диагностической значимостью определения полиморфизма ТА-повторов в промоторной области гена *UGT1A1* можно в литературе:

1. Дубровина Г. М., Ботвиньев О. К., Колотилина А. И. Сочетание синдрома Жильбера с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. // РЖГГК. 2014. №.3 С.13-21.

2. Захарова И.Н., Пыков М.И., Калоева З.В. и др. // Апостериорная ценность клинических и лабораторных проявлений синдрома Жильбера у детей. // Педиатрическая фармакология. 2011. Т. 8. № 4. С.101-104.

3. Шулятьев И.С., Носкова К.К. Клиническое значение функциональных проб в диагностике синдрома Жильбера. // Лабораторная служба. 2015. № 1. С. 20-25.

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

4. Aono S., Adachi Y., Uyama E. et al. Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome. // The Lancet. 1998. Vol. 345. P. 958-959.

5. Beutler E., Gelbart T. and Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: A balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95, P. 8170–8174.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

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

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

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.

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

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

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

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика UGT1A1», 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.

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

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

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