



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БИОЛИНК»

 Корниенко А.А.

«19» декабря 2023 г.



Набор реагентов для выявления мутаций в гене *TPMT*
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
в режиме реального времени
"Real-time-PCR-TPMT-2M"
по ТУ 21.20.23-013-57201404-2022

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Содержание

Содержание	1
Введение	3
1 Назначение набора	3
2 Характеристика набора	4
2.1 Варианты исполнения	4
2.2 Состав набора реагентов	4
2.3 Число анализируемых проб	4
2.4 Принцип действия набора	5
3 Аналитические и диагностические характеристики набора	6
3.1 Предел обнаружения	6
3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ	6
3.3 Характеристики аналитической эффективности	6
3.4 Диагностическая специфичность	7
3.5 Диагностическая чувствительность	7
3.6 Ограничения при применении	7
3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа	7
4 Риски, связанные с применением набора реагентов	7
5 Меры предосторожности	8
6 Оборудование и материалы	9
6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов	9
6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов	10
7 Анализируемые пробы	11
8 Подготовка компонентов для анализа	11
9 Проведение анализа	12
9.1 Постановка ПЦР на мутаций гена <i>TPMT</i>	12
9.2 Программирование и запуск термоциклера	13
10 Анализ результатов	14
10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР	14
10.2 Оценка пригодности клинических образцов ДНК	15
10.3 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций в гене <i>TPMT</i>	15
11 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации	17
11.1 Условия хранения	17
11.2 Условия транспортирования	17
11.3 Условия эксплуатации	17

12	Гарантийные обязательства	18
13	Маркировка	18
	Библиография	19
	Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel»	20
	Обработка результатов для термоциклера «С1000 Touch» с модулем «CFX96» .	20
	Обработка результатов для амплификатора «ДТпрайм»	22

Введение

Ген *TPMT* кодирует цитоплазматический фермент тиопурин S-метилтрансферазу (TPMT), который катализирует S-метилование ароматических и гетероциклических сульфгидрильных соединений, включающих производные тиопурина (меркаптопурин, тиогуанин и азатиоприн), предотвращая избыточное образование активных метаболитов – тиогуаниновых нуклеотидов [1].

Известно более 30 аллельных вариантов гена *TPMT*, однако у 80-95% людей со сниженной активностью фермента TPMT встречаются четыре аллельных варианта: TPMT*3A (с.460G>A и с.719A>G), TPMT*3C (с.719A>G), TPMT*3B (с.460G>A), TPMT*2 (с.238G>C). В европейской популяции наиболее распространённым является вариант TPMT*3A, в азиатской и африканской – TPMT*3C, в популяциях Южной Америки и Среднего Востока, особенно в Иранской популяции, – TPMT*2.

Однонуклеотидные полиморфные замены в гене *TPMT* приводят к снижению активности фермента TPMT, в результате чего введение стандартных доз лекарственных препаратов тиопуриновой группы приводит к накоплению тиогуаниновых нуклеотидов и миелосупрессии [2].

В соответствии с клиническими рекомендациями «Болезнь Крона у детей» рекомендовано проведение исследования активности тиопурин метилтрансферазы (ТПМТ, TPMT) перед началом терапии аналогами пурина (тиопуринами) с целью выявления пациентов с высоким риском миелосупрессии [3].

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения мутаций A719G, G460A в гене *TPMT* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Функциональное назначение: вспомогательное средство в диагностике, исследование активности тиопурин метилтрансферазы (ТПМТ) перед началом терапии аналогами пурина (тиопуринами) с целью выявления пациентов с высоким риском миелосупрессии.

Материалом для проведения ПЦР является ДНК, выделенная из крови. Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

Демографические и популяционные аспекты применения: без ограничений. Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

Требования к квалификации пользователей: только квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики (врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник).

2 Характеристика набора

2.1 Варианты исполнения

«Набор реагентов для выявления мутаций в гене *TPMT* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-TPMT-2M" по ТУ 21.20.23-013-57201404-2022» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в двух вариантах исполнения:

- 1) Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-TPMT-2M (12)";
- 2) Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-TPMT-2M (36)".

2.2 Состав набора реагентов

Набор содержит пробирки с реагентами (таблица 1), инструкцию по применению и паспорт качества.

Таблица 1. Состав набора реагентов

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объём реагента	
			на 12 реакций	на 36 реакций
1	Жёлтый	ПЦР-смесь A719G ¹	270 мкл	750 мкл
2	Жёлтый	ПЦР-смесь G460A ¹	270 мкл	750 мкл
3	Синий	Taq ДНК-полимераза	15 мкл	25 мкл
4	Красный	ПКО ²	15 мкл	45 мкл
5	Белый	ОКО ³	15 мкл	45 мкл

¹) ПЦР-смесь не содержит Taq ДНК-полимеразу.

²) ПКО – положительный контрольный образец, содержащий ДНК с фрагментом гена *TPMT* с мутациями A719G, G460A и ДНК человека без мутаций гена *TPMT*;

³) ОКО – отрицательный контрольный образец, содержащий воду без нуклеаз.

Компоненты набора в рабочих концентрациях не токсичны, не обладают канцерогенным и мутагенным действием.

2.3 Число анализируемых проб

Набор реагентов на 12 реакции "Real-time-PCR-TPMT-2M (12)" содержит реактивы для проведения 12 реакций, что позволяет проанализировать в одной постановке десять клинических образцов, положительный и отрицательный контроль.

Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-TPMT-2M (36)" содержит реактивы для проведения 36 реакций, что позволяет проанализировать 30

клинических образцов в трёх постановках по 10 клинических образцов с положительным и отрицательным контролем или 34 клинических образца с положительным и отрицательным контролем в одной постановке.

2.4 Принцип действия набора

Принцип действия набора реагентов основан на методе аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с детекцией сигнала с помощью TaqMan зондов.

В состав набора входят ПЦР-смесь A719G, ПЦР-смесь G460A, которые содержат все необходимые реагенты за исключением Taq ДНК полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке.

ПЦР-смеси A719G и G460A содержат реагенты для контрольной реакции и аллель-специфичной реакции. Мишенью для контрольной реакции является участок ДНК гена *TPMT* дикого типа. В аллель-специфичной реакции происходит избирательная амплификация фрагментов ДНК гена *TPMT*, содержащих мутацию A719G или G460A, соответственно, за счёт использования праймера, который комплементарен последовательности ДНК с этой мутацией.

Продукты аллель-специфичной реакции на мутации A719G и G460A детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM, а продукты контрольной реакции детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором ROX (таблица 2).

Таблица 2. ПЦР-смеси с указанием мутаций гена *TPMT* и каналов детекции

Название ПЦР-смеси	Мишень	Канал
ПЦР-смесь A719G	A719G	FAM
	Контроль	ROX
ПЦР-смесь G460A	G460A	FAM
	Контроль	ROX

Для контроля в состав набора входят положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО). ПКО содержит смесь ДНК ампликонов с фрагментами гена *TPMT* с мутациями A719G, G460A и ДНК человека без мутаций в 719-й, 460-й позициях гена *TPMT*. ОКО содержит воду без нуклеаз. В каждом эксперименте используют ПКО и ОКО. Все исследуемые и контрольные образцы тестируют однократно с каждой смесью.

В аллель-специфичной реакции величина *Ct* для образцов ДНК, содержащих ген *TPMT* без мутации, на несколько циклов выше, чем величина *Ct* для образцов ДНК, содержащих ген *TPMT* с соответствующей мутацией. Наличие мутации в

образце ДНК определяется по разнице между значениями C_t по каналам FAM и ROX для каждой ПЦР-смеси.

3 Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 2 нг/мкл ДНК с мутацией A719G гена *TPMT*, 2 нг/мкл ДНК с мутацией G460A гена *TPMT*.

Минимальное количество ДНК, необходимое для проведения анализа, составляет 10 мкл.

3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ

Под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов специфически определять наличие мутаций A719G, G460A в гене *TPMT* на фоне ДНК гена *TPMT* без мутаций, что обеспечивается с помощью специфически подобранных праймеров и зондов, проверенных на контрольных образцах. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации для образцов ДНК, несущих ген *TPMT* без мутаций A719G, G460A.

Аналитическая специфичность целевых участков гена *TPMT* подтверждена *in silico* с помощью ресурса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец ДНК, относятся следующие вещества: гемоглобин, общий белок крови, триглицериды, билирубин, присутствующие в образце ДНК в результате неполного удаления в ходе выделения ДНК из крови.

Интерферирующие вещества не влияют на результаты анализа в следующих концентрациях: альбумин – 51 мг/мл, билирубин – 35,1 мкмоль/л, гемоглобин – 5 мг/мл, триглицериды – 34,23 ммоль/л.

3.3 Характеристики аналитической эффективности

Повторяемость оценивали в условиях, при которых независимые результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, одним оператором, в пределах короткого промежутка времени. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутаций A719G, G460A гена *TPMT*. Значение повторяемости результатов при определении мутаций A719G, G460A гена *TPMT* составило 100% (интервал 94,04-100% с доверительной вероятностью 95%).

Воспроизводимость оценивали в условиях, при которых результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, двумя операторами, с использованием различного оборудования, в разные дни. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутаций A719G, G460A гена *TPMT*. Значение воспроизводимости результатов при определении при определении мутаций A719G, G460A гена *TPMT* составило 100% (интервал 94,04-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.4 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении мутаций A719G, G460A гена *TPMT* в клинических испытаниях на выборке из 60 образцов, из них 30 отрицательных образцов, составила 100% (интервал 88,43-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.5 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении мутаций A719G, G460A гена *TPMT* в клинических испытаниях на выборке из 60 образцов, из них 30 положительных образцов, составила 100% (интервал 88,43-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.6 Ограничения при применении

Пригодность ДНК для анализа на наличие мутаций A719G и G460A гена *TPMT* оценивается в ПЦР по значению *Ct* по каналу ROX. Если значение *Ct* образца по каналу ROX для каждой ПЦР-смеси превышает допустимые значения, то концентрация ДНК не достаточна, результаты анализа не валидны. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа

Референтный метод анализа на наличие мутаций гена *TPMT* – секвенирование по Сэнгеру. Референтные материалы отсутствуют.

4 Риски, связанные с применением набора реагентов

Перечень опасных ситуаций, которые относятся к категории R2 «допустимый риск», зависят от человеческого фактора и не могут быть уменьшены производителем другим способом, кроме как добавлением соответствующей информации в инструкцию по применению.

1. Дегградация компонентов ПЦР-смеси или ПКО, инактивация фермента Taq ДНК-полимеразы из-за нарушения условий хранения и транспортировки или при использовании набора реагентов после истечения срока годности (возможный вред: отсутствие результата).
2. Интерпретация не валидных результатов ПЦР в случае, когда персонал не использует контрольные образцы при постановке ПЦР или не учитывает критерии достоверности (возможный вред: ложноотрицательный результат, ложноположительный результат).
3. Смещение сигналов флуоресценции из-за использования неверного значения для порогового уровня флуоресценции при анализе данных ПЦР (возможный вред: ложноотрицательный результат).

Совокупный остаточный риск является допустимым.

Противопоказания отсутствуют. Ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты, связанные с применением медицинского изделия по назначению, отсутствуют.

5 Меры предосторожности

1. Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2б согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.
2. Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.
3. Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
4. Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
5. Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
6. При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
7. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.
8. При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные

- наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.
9. Использовать только ПЦР-смесь и Taq ДНК-полимеразу, входящие в состав набора реагентов.
 10. Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
 11. Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
 12. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
 13. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно следует подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами СанПиН 3.3686-21.
 14. Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
 15. Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПиН 2.1.3684-21. **ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, реагентов и оборудования.
 16. Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

6 Оборудование и материалы

6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Амплификатор планшетного типа с детекцией флуоресценции в режиме реального времени:

Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (ООО «НПО ДНК-Технология») или термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, исполнения: «C1000 Touch» с модулем

реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) («Био-Рад Лабораториз, Инк.», США).

Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.» по ТУ 9443-004-51495026-2004 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия) или аналогичное оборудование.

Вортекс персональный V-1 plus (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

Дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Блэк» по ТУ 9443-008-33189998-2009 (АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия) или аналогичное оборудование.

Компьютер с операционной системой Windows XP Professional SP3 или Windows 7 и выше, жёстким диском не менее 10 ГБ, тактовой частотой процессора не менее 2.0 ГГц, оперативной памятью не менее 1 ГБ, разрешением экрана не менее 1024*768, программным обеспечением Microsoft Office Excel версии 2003 или выше.

Термостат типа «Драй-блок» TDB-120, вариант исполнения: I. Термостат TDB-120 с крышкой и термоблоком А-53.

Холодильник бытовой с холодильной (от 2°C до 8°C) и морозильной камерами (от минус 18°C до минус 25°C) (например, ATLANT XM-6023-031 «ATLANT», Белоруссия).

Центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000 с принадлежностями: ротор R-2, ротор R-6, ротор R-12/10, ротор R-12/15 (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

Контейнер для сброса отходов («КМ-ПРОЕКТ», Россия) или аналогичный.

Микроцентрифужные пробирки градуированные объёмом 1,5 мл («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

Набор реагентов для выделения ДНК из крови, зарегистрированный в РФ, например, «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008» («ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия).

Наконечники универсальные для дозаторов с фильтром объёмом от 0,1 мкл до 1000 мкл («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные («ТГ Медикал Сдн. Бхд.», Малайзия) или аналогичные.

Пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 штук или плашки для ПЦР на 96 лунок («Корнинг Инк.», США) или аналогичные.

Реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови «ГЕМОЛИТИК» по ТУ 9398-097-01897593-2010 («ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия).

Штатив для пробирок, 80 ячеек и/или штатив для пробирок, 96 ячеек («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

7 Анализируемые пробы

В качестве материала для проведения ПЦР используют клинические образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови.

Для выделения ДНК из цельной крови используют зарегистрированные в РФ наборы реагентов. Рекомендуется провести предварительную обработку цельной крови с использованием реагента для селективного лизиса эритроцитов крови, например, «Реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови «ГЕМОЛИТИК» по ТУ 9398-097-01897593-2010» («ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора»). Затем провести экстракцию нуклеиновых кислот с помощью набора «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008» («ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора»).

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к набору для выделения ДНК.

ВНИМАНИЕ! Образцы крови хранить до момента выделения ДНК при температуре от 2°C до 8°C не более 48 часов. Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

8 Подготовка компонентов для анализа

ПЦР-смесь А719G, ПЦР-смесь G460A, ПКО и ОКО разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C, убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 1-2 сек при 1000 об/мин., чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

ВНИМАНИЕ! После приготовления смесей для ПЦР немедленно поместить оставшиеся реагенты в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

ВНИМАНИЕ! Помимо клинических образцов ДНК в каждой постановке необходимо использовать ПКО и ОКО, входящие в состав набора реагентов.

9 Проведение анализа

9.1 Постановка ПЦР на мутации гена *TPMT*

9.1.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ПКО и ОКО с учётом погрешности при пипетировании. Состав реакционной смеси на одну реакцию приведен в таблице 3, для тестирования N клинических образцов это количество необходимо умножить на (N + 5).

Таблица 3. Количество реагентов на одну реакцию

Реагент	Количество
ПЦР-смесь (без полимеразы)	19,8 мкл
Taq ДНК-полимераза	0,2 мкл

9.1.2 ПЦР-смесь A719G (пробирка №1, жёлтая крышка), ПЦР-смесь G460A (пробирка №2, жёлтая крышка), ПКО (пробирка №4, красная крышка) и ОКО (пробирка №5, белая крышка) разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C. Убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и кратко центрифугировать, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

9.1.3 Промаркировать две чистые пробирки объёмом 1,5 мл для реакционных смесей. Внести в пробирку №1 ПЦР-смесь A719G, в пробирку №2 – ПЦР-смесь G460A. Добавить в каждую пробирку для реакционных смесей Taq ДНК-полимеразу и перемешать на вортексе 1 раз в течение 3 секунд (или пипетированием 8-10 раз). Центрифугировать смеси 5 сек в мини-центрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок. Реакционные смеси готовы.

ВНИМАНИЕ! Использовать немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходных ПЦР-смесей и Taq ДНК-полимеразы немедленно поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

9.1.4 Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок. **ВНИМАНИЕ!** Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать стрипы на крышках!

Пример расположения клинических и контрольных образцов при анализе шести образцов ДНК с использованием стрипов по восемь пробирок приведен на рисунке 1.

ПЦР-смесь	Клинические образцы ДНК						Образцы из набора	
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
A719G	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
G460A	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО

Рисунок 1. Схема расположения шести образцов ДНК и контрольных образцов при использовании стрипов по восемь пробирок. Указаны ПЦР-смеси, номера образцов ДНК, ОКО и ПКО

9.1.5 Добавить в стрипы по 20 мкл готовой реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой в соответствии со схемой и закрыть крышки.

9.1.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

- по 5 мкл клинических образцов ДНК в соответствующие пробирки;
- по 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;
- по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

9.1.7 Закрывать крышки и перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

9.1.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

9.1.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

9.2 Программирование и запуск термоциклера

9.2.1 Запрограммировать термоциклер для проведения ПЦР и детекции флуоресценции в соответствии с руководством по эксплуатации и п. 9.2.2-9.2.4.

9.2.2 Задать объем реакционной смеси 25 мкл. Запрограммировать протокол проведения ПЦР в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Протокол ПЦР в реальном времени

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	3 мин	Нет
5	Денатурация	95°C	10 сек	
	Отжиг праймеров, элонгация	58°C	30 сек	
35	Денатурация	95°C	10 сек	Да
	Отжиг праймеров, элонгация	58°C	30 сек	

9.2.3 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

- FAM – регистрация сигнала в аллель-специфичной реакции,
- ROX – регистрация сигнала в контрольной реакции.

9.2.4 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

9.2.5 Запустить протокол ПЦР.

10 Анализ результатов

10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

10.1.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для каждого образца определить значение порогового цикла (C_t) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает пороговый уровень (threshold level). Для получения величин C_t использовать логарифмическую шкалу и выставить вручную пороговый уровень 200 для каналов FAM и ROX.

10.1.2 Проверить значения C_t по каналам ROX и FAM последовательно для ОКО, ПКО и клинических образцов ДНК.

10.1.3 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *TPMT* только в том случае, если величины C_t для ОКО и ПКО имеют допустимые значения (таблица 5):

- для ОКО в ПЦР не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и ROX, не определяется значение C_{tFAM} , C_{tROX} либо C_{tFAM} , C_{tROX} больше $C_{tPKO}+6$ (C_{tPKO} – значение C_t ПКО по тому же каналу той же смеси);
- для ПКО в ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение C_{tPKO} меньше или равно значению QC_{FAM} для каждой смеси для соответствующего амплификатора;
- для ПКО в ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение C_{tPKO} меньше или равно значению QC_{ROX} для каждой смеси для соответствующего амплификатора;

Таблица 5. Допустимые значения C_t для контрольных образцов

ПЦР	Допустимое значение C_t для образца	
	ОКО	ПКО
ПЦР со смесью A719G	C_{tROX} не определено или $C_{tROX} > C_{tPKO}+6$; C_{tFAM} не определено или $C_{tFAM} > C_{tPKO}+6$	$C_{tROX} \leq QC_{ROX}^1$; $C_{tFAM} \leq QC_{FAM}^1$
ПЦР со смесью G460A		

¹⁾ Значения QC_{ROX} и QC_{FAM} для каждого амплификатора («CFX96» и «ДТпрайм») указаны в паспорте качества набора реагентов.

10.1.4 Если величины C_t контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если после повторного анализа значения C_t не соответствуют допустимым пределам, то результаты анализа не валидны. Возможные проблемы представлены в таблице 6.

Таблица 6. Другие значения C_t для контрольных образцов и возможные проблемы

Образец	Значение C_t	Возможные проблемы
ОКО	$C_{t_{ROX}} \leq C_{t_{ПКО}} + 6$ $C_{t_{FAM}} \leq C_{t_{ПКО}} + 6$	Возможна контаминация.
ПКО	$C_{t_{ROX}} > Q_{C_{ROX}}$ $C_{t_{FAM}} > Q_{C_{FAM}}$	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.

10.2 Оценка пригодности клинических образцов ДНК

10.2.1 Сравнить значения C_t по каналу ROX для каждого из клинических образцов ДНК ($C_{t_{ROX}}$) со значением C_t ПКО ($C_{t_{ПКО}}$) для каждой ПЦР-смеси.

10.2.2 Если значение $C_{t_{ROX}} \leq C_{t_{ПКО}} + 4$ для ПЦР-смеси A719G, то концентрация ДНК оптимальна для проведения анализа на наличие мутации A719G в гене *TPMT*.

10.2.3 Если значение $C_{t_{ROX}} \leq C_{t_{ПКО}} + 4$, для ПЦР-смеси G460A, то концентрация ДНК оптимальна для проведения анализа на наличие мутации G460A в гене *TPMT*.

10.2.4 Если значение $C_{t_{ROX}}$ не определено или $C_{t_{ROX}} > C_{t_{ПКО}} + 4$ для любой из ПЦР-смесей, то концентрация ДНК не достаточна для проведения анализа на наличие мутаций в гене *TPMT*. Необходимо повторить выделение ДНК.

10.3 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций в гене *TPMT*

10.3.1 Для каждого клинического образца для каждой мутации рассчитать значения $\Delta C_t = C_{t_{FAM}} - C_{t_{ROX}}$, где $C_{t_{FAM}}$ – C_t образца по каналу FAM, $C_{t_{ROX}}$ – C_t образца по каналу ROX. Рекомендации по расчёту ΔC_t в программе «MS Office Excel» приведены в приложении А.

10.3.2 Сравнить полученные значения ΔC_t клинического образца ДНК со значениями точек отсечения (TO_{50} и TO_{100}) для мутации A719G ($TO_{50 \text{ A719G}}$ и $TO_{100 \text{ A719G}}$) и для мутации G460A ($TO_{50 \text{ G460A}}$ и $TO_{100 \text{ G460A}}$). Значения точек отсечения для каждого амплификатора указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте качества.

10.3.3 Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутации A719G, G460A в гене *TPMT*), если значение ΔC_t больше TO_{50} для определяемой мутации или если значение $C_{t_{FAM}}$ образца не определено.

10.3.4 Образец учитывается как положительный, содержащий мутацию в гене *TPMT* в гетерозиготном состоянии, если значение ΔC_t меньше или равно значению TO_{50} , но больше значения TO_{100} для определяемой мутации.

10.3.5 Образец учитывается как положительный, содержащий мутацию в гене *TPMT* в гомозиготном состоянии, если значение ΔC_t меньше или равно значению TO_{100} для определяемой мутации.

10.3.6 В подавляющем большинстве образцов мутации A719G, G460A обнаруживаются одновременно (аллельный вариант *TPMT**3A.) Если для образца результаты отличаются (в одной ПЦР-смеси положительный, а во второй отрицательный), то рекомендовано проанализировать образец повторно с обеими ПЦР-смесями в дублях, чтобы подтвердить обнаружение более редкого аллельного варианта (*TPMT**3B – мутация G460A или *TPMT**3C – мутация A719G).

11 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации

11.1 Условия хранения

11.1.1 Хранить набор реагентов при температуре от минус 18°C до минус 25°C в течение всего срока годности в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, не допуская проникновения света.

11.1.2 Не подвергать набор реагентов замораживанию и размораживанию более трёх раз, общее время нахождения после оттаивания при температуре 22°C – не более 30 минут.

11.1.3 Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска или 3 месяца после первого вскрытия упаковки набора в зависимости от того, какая дата наступит раньше.

11.2 Условия транспортирования

11.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре не выше минус 18°C.

11.2.2 Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы (ХТЛ-4, ООО «Термологика» или аналогичные).

11.2.3 Срок транспортирования – не более 5 суток.

11.2.4 При транспортировании необходимо соблюдать условия, обеспечивающие сохранность набора реагентов от механического повреждения, неблагоприятного воздействия температуры окружающей среды, воздействия солнечного света.

ВНИМАНИЕ! Если реагенты прибыли незамороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «БиоЛинк» (см. раздел 12).

11.3 Условия эксплуатации

11.3.1 Использовать набор реагентов при комнатной температуре (от 18°C до 25°C).

11.3.2 Строго соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

11.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

12 Гарантийные обязательства

12.1 Производитель гарантирует соответствие качества набора реагентов требованиям нормативной и технической документации при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

12.3 В случае нарушения условий транспортирования, обнаружения повреждений упаковки, а также по вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обратиться к производителю ООО «БиоЛинк».

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13
Телефон: +7 (383) 209-32-40
Электронная почта: info@biolinklab.ru
Веб-сайт: biolinklab.ru

13 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Не допускать воздействия солнечного света		Дата изготовления (месяц, год)
	Обратитесь к инструкции по применению		Использовать до (месяц, год)
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Изготовитель

Библиография

1. Understanding thiopurine methyltransferase polymorphisms for the targeted treatment of hematologic malignancies. / R. Franca, S. Braidotti, G. Stocco, G. Decorti // Expert Opin Drug Metab Toxicol. – 2021. – Vol. 17 (10). – P. 1187-1198. DOI: 10.1080/17425255.2021.1974398
2. Thiopurine S-Methyltransferase as a Pharmacogenetic Biomarker: Significance of Testing and Review of Major Methods. / C. Asadov, G. Aliyeva, K. Mustafayeva // Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. – 2017. – Vol. 15 (1). – P. 23-30. DOI:10.2174/1871525715666170529091921
3. Клинические рекомендации. Болезнь Крона. / Союз педиатров России. Общероссийская общественная организация «Российская ассоциация детских хирургов». Автономная некоммерческая организация «Общество детских гастроэнтерологов, гепатологов и нутрициологов» // Год утверждения (частота пересмотра): 2021 (2023). – 115 с.

Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel»

Обработка результатов для термоциклера «C1000 Touch» с модулем «CFX96»

Экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel».

В столбце «Target» (рисунок А1, элемент 2) обозначить ячейки, соответствующие контрольной реакции и аллель-специфичной реакции для каждой мутации. В приведённом на рисунке А1 примере «as» – обозначение для аллель-специфичной реакции, «k» – обозначение для контрольной реакции. Для удобства выполнить сортировку по столбцу «Sample» (по названию образца) и затем по столбцу «Target».

Добавить новый столбец «Ct ROX». Скопировать значения Ct по каналу ROX в столбце «Cq» (рисунок А1, элемент 4) и вставить в сформированный столбец «Ct ROX» (рисунок А1, элемент 5) таким образом, чтобы значения Ct_{FAM} и Ct_{ROX} для каждого образца находились в одной строке, соответствующей этому образцу.

Добавить столбец « ΔCt ». Используя функцию вычитания, для каждого образца рассчитать значение $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{ROX}$ (рисунок А1, элемент 6).

Добавить столбцы « TO_{50} » и « TO_{100} », внести значения TO_{50} и TO_{100} для каждой мутации для термоциклера «CFX96» (рисунок А1, элементы 7 и 8).

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔCt клинических образцов ДНК со значением TO_{50} и TO_{100} для каждой мутации и записать результат (рисунок А1, элемент 9).

Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутации в гене *TPMT*), если значение ΔCt больше TO_{50} для определяемой мутации, или если значение Ct_{FAM} образца не определено.

Образец учитывается как положительный, содержащий мутацию в гене *TPMT* в гетерозиготном состоянии, если значение ΔCt меньше или равно значению TO_{50} , но больше значения TO_{100} для определяемой мутации.

Образец учитывается как положительный, содержащий мутацию в гене *TPMT* в гомозиготном состоянии, если значение ΔCt меньше или равно значению TO_{100} для определяемой мутации.

Well	1 Fluor	2 Target	Content	3 Sample	4 Cq	5 Ct ROX	6 ΔCt	7 TO 50	8 TO 100	9 Результат
A04	FAM	A719G as	Unkn-1	ДНК1	22,05	14,73	7,32	2,6	-0,4	отрицательный
D04	FAM	A719G as	Unkn-2	ДНК2	19,01	21,98	-2,96	2,6	-0,4	положительный
A05	FAM	A719G as	Unkn-3	ДНК3	19,35	18,16	1,19	2,6	-0,4	положительный
G06	FAM	A719G as	NTC-1	ОКО						
G05	FAM	A719G as	Pos Ctrl-1	ПКО	19,37		ΔCt_{A719G}	TO_{A719G}		
A04	ROX	A719G k	Unkn-1	ДНК1	14,73					
D04	ROX	A719G k	Unkn-2	ДНК2	21,98					
A05	ROX	A719G k	Unkn-3	ДНК3	18,16					
G06	ROX	A719G k	NTC-1	ОКО						
G05	ROX	A719G k	Pos Ctrl-1	ПКО	18,15					
D06	FAM	G460A as	Unkn-6	ДНК1	23,91	16,33	7,58	0,3	-2,2	отрицательный
A07	FAM	G460A as	Unkn-7	ДНК2	18,19	21,38	-3,19	0,3	-2,2	положительный
D07	FAM	G460A as	Unkn-8	ДНК3	19,22	20,10	-0,88	0,3	-2,2	положительный
G08	FAM	G460A as	NTC-2	ОКО						
G07	FAM	G460A as	Pos Ctrl-2	ПКО	19,09		ΔCt_{G460A}	TO_{G460A}		
D06	ROX	G460A k	Unkn-6	ДНК1	16,33					
A07	ROX	G460A k	Unkn-7	ДНК2	21,38					
D07	ROX	G460A k	Unkn-8	ДНК3	20,10					
G08	ROX	G460A k	NTC-2	ОКО						
G07	ROX	G460A k	Pos Ctrl-2	ПКО	19,77					

Рисунок В1. Обработка данных в программе «MS Office Excel»

- 1 – в столбце «Fluor» указан канал для регистрации флуоресценции (FAM, ROX)
- 2 – в столбце «Target» обозначены ячейки, соответствующие контрольной реакции и аллель-специфичной реакции для каждой мутации.
- 3 – в столбце «Sample» обозначены номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.
- 4 – столбец «Cq», откуда скопированы значения Ct по каналу ROX.
- 5 – столбец «Ct ROX», в который вставлены значения Ct по каналу ROX из столбца «Cq».
- 6 – вычисление значений ΔCt по формуле $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{ROX}$.
- 7 – значение TO_{50} для каждой мутации для термоциклера «CFX96» (указано на упаковке набора и в паспорте качества).
- 8 – значение TO_{100} для каждой мутации для термоциклера «CFX96» (указано на упаковке набора и в паспорте качества).
- 9 – результат анализа на наличие мутаций A719G и G460A в гене *TPMT*.

В приведённом на рисунке A1 примере $TO_{50 A719G} = 2,6$; $TO_{100 A719G} = -0,4$, $TO_{50 G460A} = 0,3$; $TO_{100 G460A} = -2,2$.

Образец ДНК1 учитывается как отрицательный, то есть, не содержащий мутации в гене *TPMT*, поскольку для этого образца значение ΔCt_{A719G} равно 7,32 (больше $TO_{50 A719G} = 2,6$), значение ΔCt_{G460A} равно 7,58 (больше $TO_{50 G460A} = 0,3$).

Образец ДНК2 учитывается как положительный, содержащий мутации A719G и G460A в гене *TPMT* в гомозиготном состоянии, так как значение ΔCt_{A719G} составляет $-2,96$ (меньше $TO_{100\ A719G} = -0,4$), значение ΔCt_{G460A} составляет $-3,19$ (меньше $TO_{100\ G460A} = -2,2$).

Образец ДНК3 учитывается как положительный, содержащий мутации A719G и G460A в гене *TPMT* в гетерозиготном состоянии, так как значение ΔCt_{A719G} составляет $1,19$ (меньше $TO_{50\ A719G} = 2,6$, но больше $TO_{100\ A719G} = -0,4$), а значение ΔCt_{G460A} составляет $-0,88$ (меньше $TO_{50\ G460A} = 0,3$, но больше $TO_{100\ G460A} = -2,2$).

Обработка результатов для амплификатора «ДТпрайм»

Экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel». Столбцы «result» и «dCt» экспортируются автоматически из программного обеспечения амплификатора «ДТпрайм». Эти столбцы следует игнорировать при анализе результатов или удалить.

Программное обеспечение амплификатора «ДТпрайм» присваивает сквозную нумерацию образцам, поэтому необходимо сопоставить названия образцов в ПЦР с разными смесями. В приведённом на рисунке А2 примере «образец_1», «образец_2» и «образец_3» – это образцы ДНК1, ДНК2 и ДНК3 в ПЦР со смесью A719G, а «образец_6», «образец_7» и «образец_8» – это те же образцы ДНК1, ДНК2 и ДНК3 в ПЦР со смесью G460A.

Добавить столбец « ΔCt ». Используя функцию вычитания, для каждого образца рассчитать значение $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{ROX}$ (рисунок А2, элемент 4).

Добавить столбцы « TO_{50} » и « TO_{100} », внести значения TO_{50} и TO_{100} для каждой мутации для амплификатора «ДТпрайм» (рисунок А2, элементы 5 и 6).

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔCt клинических образцов ДНК со значениями TO_{50} и TO_{100} для каждой мутации и записать результат (рисунок А1, элемент 7).

Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутации в гене *TPMT*), если значение ΔCt больше TO_{50} для определяемой мутации, или если в аллель-специфичной ПЦР значение Ct_{FAM} образца не определено.

Образец учитывается как положительный, содержащий мутацию в гене *TPMT* в гетерозиготном состоянии, если значение ΔCt меньше или равно значению TO_{50} , но больше значения TO_{100} для определяемой мутации.

Образец учитывается как положительный, содержащий мутацию в гене *TPMT* в гомозиготном состоянии, если значение ΔCt меньше или равно значению TO_{100} для определяемой мутации.

1	2	3	4	5	6	7
id	Ct FAM	Ct ROX	ΔCt	TO 50	TO 100	Результат
Образец_1	nd	11,3	#ЗНАЧ!	1,94	-0,6	отрицательный
Образец_2	15,5	18,6	-3,10	1,94	-0,6	положительный
Образец_3	15,7	14,8	0,90	1,94	-0,6	положительный
K+	16	15,1	ΔCt_{A719G}	TO_{A719G}		
K-						
Образец_6	17,5	12,9	4,60	0,6	-1,9	отрицательный
Образец_7	15,6	18	-2,40	0,6	-1,9	положительный
Образец_8	16,2	16,7	-0,50	0,6	-1,9	положительный
K+	16,2	16,8	ΔCt_{G460A}	TO_{G460A}		
K-						

Рисунок А2. Обработка данных в программе «MS Office Excel»

- 1 – в столбце «id» обозначены номера образцов ДНК, ПКО (K+) и ОКО (K-).
- 2 – столбец «Ct FAM», значения Ct образцов по каналу FAM.
- 3 – столбец «Ct ROX», значения Ct образцов по каналу ROX.
- 4 – вычисление значений ΔCt по формуле $\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{ROX}$.
- 5 – значение TO_{50} для каждой мутации для амплификатора «ДТпрайм» (указано на упаковке набора и в паспорте качества).
- 6 – значение TO_{100} для каждой мутации для амплификатора «ДТпрайм» (указано на упаковке набора и в паспорте качества).
- 7 – результат анализа на наличие мутаций A719G и G460A в гене *TPMT*.
#ЗНАЧ! – ошибка в значении

В приведённом на рисунке А2 примере $TO_{50 A719G} = 1,94$; $TO_{100 A719G} = -0,6$, $TO_{50 G460A} = 0,6$; $TO_{100 G460A} = -1,9$.

Образец ДНК1 учитывается как отрицательный, то есть, не содержащий мутации в гене *TPMT*, поскольку для этого образца значение Ct_{FAM} в аллель-специфичной ПЦР на мутацию A719G не определено, значение ΔCt_{G460A} равно 4,60 (больше $TO_{50 G460A} = 0,6$).

Образец ДНК2 учитывается как положительный, содержащий мутации A719G и G460A в гене *TPMT* в гомозиготном состоянии, так как значение ΔCt_{A719G} составляет -3,10 (меньше $TO_{100 A719G} = -0,6$), значение ΔCt_{G460A} составляет -2,40 (меньше $TO_{100 G460A} = -1,9$).

Образец ДНК3 учитывается как положительный, содержащий мутации A719G и G460A в гене *TPMT* в гетерозиготном состоянии, так как значение ΔCt_{A719G} составляет 0,90 (меньше $TO_{50 A719G} = 1,94$, но больше $TO_{100 A719G} = -0,6$), а значение ΔCt_{G460A} составляет -0,50 (меньше $TO_{50 G460A} = 0,6$, но больше $TO_{100 G460A} = -1,9$).

Производитель: ООО «БиоЛинк»

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: (383) 209-32-40

E-mail: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru