ООО «АБВ-ТЕСТ»
121205, г. Москва, тер. Инновационного Центра Сколково, ул. Нобеля, дом № 7, этаж 2, Часть Помещ. 51

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ООО «АБВ-ТЕСТ»
_____Д. В. Шеверда
«02» февраля 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики in vitro

«ТК-SMA»

Набор реагентов для выделения и количественного определения ДНК TREC, KREC и качественного выявления гомозиготной делеции экзона 7 гена SMN1 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по ТУ 21.20.23-004-17608775-2021

НАЗНАЧЕНИЕ

««ТК-SMA» Набор реагентов для выделения и количественного определения ДНК TREC, KREC и качественного выявления гомозиготной делеции экзона 7 гена SMN1 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по ТУ 21.20.23-004-17608775-2021» (далее по тексту – набор реагентов), предназначен для выделения и количественного определения ДНК TREC[1] и KREC[2], а также качественного выявления гомозиготной делеции экзона 7 гена SMN1[3] из образцов цельной крови или сухих пятен крови человека (далее по тексту – анализируемые образцы) методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени (далее по тексту – ПЦР-РВ).

Набор реагентов используется как вспомогательное средство для диагностики патологических состояний, вызванных недостатком Т- и В- клеток, и гомозиготной делецией экзона 7 гена SMN1 без градации по демографическому или популяционному признаку.

[1] TREC – T cell receptor (TCR) excision circles – эксцизионное кольцо Т-клеточного рецептора
[2] KREC – kappa-deleting recombination excision circle - рекомбинационное кольцо каппа-делеционного элемента
[3] SMN1 – survival of motor neuron 1 – ген кодирующий белок ответственный за функционирование двигательных нейронов

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

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению: выявление патологических состояний, вызванных недостатком лимфопоэза Т- и В- клеток и/или спинальной мышечной атрофии (далее по тексту – СМА), ассоциированной с гомозиготной делецией экзона 7 гена SMN1.

Противопоказания к применению: Противопоказаний в рамках установленного производителем назначения не имеет.

Сокращенное наименование медицинского изделия для диагностики *in vitro*

«**ТК-SMA**»

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ

Набор реагентов предназначен для выделения и количественного определения молекул ДНК TREC и KREC, а также качественного определения гомозиготной делеции экзона 7 гена SMN1 в цельной крови и в сухих пятнах крови с целью оценки функционального состояния иммунной системы пациентов и скрининга иммунодефицитных состояний (ИДС), скрининга на наличие СМА без градации по демографическому или популяционному признаку.

Молекулы TREC и KREC – стабильные кольцевые фрагменты ДНК, образующиеся в ходе перестройки генов рецепторов Т- и В-клеток, соответственно. У здоровых новорожденных TREC и KREC образуются в больших количествах, в то время как у детей с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью (ТКИН) и агаммаглобулинемией количество TREC и KREC значительно снижено или находятся на недетектируемом уровне. С возрастом, у детей и взрослых количество TREC и KREC падает. Количество TREC и KREC ниже нормы может указывать на клеточный или гуморальный иммунодефицит.

СМА – наследуемое нервно-мышечное генетическое заболевание, вызывающее поражение двигательных нейронов передних рогов спинного мозга. СМА - одно из наиболее распространённых наследуемых заболеваний в мире, в среднем наблюдается у 1 из 7500 новорожденных. У подавляющего большинства пациентов причиной СМА является гомозиготная делеция экзона 7 в гене SMN1 хромосомы 5. Гетерозиготы по этой делеции не проявляют признаков заболевания, но являются основными носителями заболевания в популяции.

2 ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Только для профессионального использования.

Сотрудники клинико-диагностических лабораторий медицинских учреждений.

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

3 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

3.1 Состав набора реагентов

Набор реагентов выпускают в виде двух комплектов: в виде комплекта 1 (96 тестов) и комплекта 2 (384 теста).

Комплект 1 и комплект 2 предназначены для ручной постановки анализа и с помощью автоматических станций для выделения нуклеиновых кислот (далее по тексту – автоматические станции) при условии, что запрограммирована последовательность действий, изложенная в данной инструкции.

Состав комплектов представлен в таблице 1.

Т а б л и ц а 1 – Состав набора реагентов

Наименование	**Комплект 1 96 тестов**		**Комплект 2 384 теста**	
Вариант исполнения	**Вариант 1**	**Вариант 2**	**Вариант 1**	**Вариант 2**
Компоненты для выделения. Упаковка 1	**1 шт. в составе:**	**1 шт. в составе:**	**4 шт. в составе:**	**4 шт. в составе:**
«ПЛ» – предлизирующий раствор – прозрачная бесцветная или от светло-желтого до желтого цвета жидкость, допускается выпадение кристаллов и хлопьев белого цвета. Опасные вещества: гуанидин тиоцианат Консервант: не более 0,15% проклин 300	1 фл. (22,0 мл)	1 фл. (22,0 мл)	1 фл. (22,0 мл)	1 фл. (22,0 мл)
«ЛБ» – лизирующий раствор – прозрачная от бесцветного до коричневого цвета жидкость с взвесью магнитных частиц коричневого или черного цвета. Допускается расслоение на надосадочную жидкость и осадок магнитных частиц. Допускается выпадение кристаллов и хлопьев белого цвета. После встряхивания образуется однородный раствор со взвесью магнитных частиц коричневого или черного цвета. Опасные вещества: гуанидин тиоцианат Консервант: не более 0,15% проклин 300	1 фл. (27,0 мл)	1 фл. (27,0 мл)	1 фл. (27,0 мл)	1 фл. (27,0 мл)
«РП» – раствор для преципитации – прозрачная бесцветная жидкость. Опасные вещества: изопропанол	1 фл. (50,0 мл)	1 фл. (50,0 мл)	1 фл. (50,0 мл)	1 фл. (50,0 мл)
«ПР» – раствор для отмывки – прозрачная бесцветная жидкость. Опасные вещества: изопропанол Консервант: не более 0,15% проклин 300	3 фл. (по 80,0 мл)	3 фл. (по 80,0 мл)	3 фл. (по 80,0 мл)	3 фл. (по 80,0 мл)

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

«ЭР» – раствор для элюции – прозрачная бесцветная жидкость. Консервант: не более 0,15% проклин 300	1 фл. (12,0 мл)	1 фл. (12,0 мл)	1 фл. (12,0 мл)		1 фл. (12,0 мл)	
Эксплуатационная документация:						
Инструкция по применению набора реагентов	1 шт.	1 шт.	1 шт.		1 шт.	
Компоненты для ПЦР-РВ. Упаковка 2	**1 шт. в составе:**	**1 шт. в составе:**	**1 шт. в составе:**		**1 шт. в составе:**	
Блистер (ы) в Упаковке 2	Блистер 1 1 шт.	Блистер 1 1 шт.	Блистер 1 1 шт.	Блистер 2 1 шт.	Блистер 1 1 шт.	Блистер 2 1 шт.
«5×ПЦР-буфер» – буфер для полимеразной цепной реакции – прозрачная бесцветная жидкость **Консервант**: не более 0,1% проклин 300	1 пр. (0,6 мл)	1 пр. (0,6 мл)	1 пр. (0,6 мл)	3 пр. (по 0,6 мл)	1 пр. (0,6 мл)	3 пр. (по 0,6 мл)
«ПЦР-смесь» – смесь для полимеразной цепной реакции – прозрачная светло-фиолетового цвета жидкость **Консервант**: не более 0,1% проклин 300	1 пр. (1,0 мл)	1 пр. (1,0 мл)	1 пр. (1,0 мл)	3 пр. (по 1,0 мл)	1 пр. (1,0 мл)	3 пр. (по 1,0 мл)
«Taq-полимераза» – Taq полимераза – прозрачный бесцветный вязкий раствор	1 пр. (0,12 мл)	1 пр. (0,12 мл)	1 пр. (0,12 мл)	3 пр. (по 0,12 мл)	1 пр. (0,12 мл)	3 пр. (по 0,12 мл)
«К1» – калибратор 1 – прозрачная бесцветная жидкость	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)	–	1 пр. (0,15 мл)	–
«К2» – калибратор 2 – прозрачная бесцветная жидкость	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)	–	1 пр. (0,15 мл)	–
«К3» – калибратор 3 – прозрачная бесцветная жидкость	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)	–	1 пр. (0,15 мл)	–
«К4» – калибратор 4 – прозрачная бесцветная жидкость	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)	–	1 пр. (0,15 мл)	–
«ОКО» – отрицательный контрольный образец – прозрачная бесцветная жидкость	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)	–	1 пр. (0,15 мл)	–
«ПКО» – положительный контрольный образец – прозрачная бесцветная жидкость	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)	–	1 пр. (0,15 мл)	–
Расходные материалы. Упаковка 3	–	**1 шт. в составе:**	–		**4 шт. в составе:**	
Пакет 1 – 2 шт. в составе:						
Планшет глубоколуночный 2,2 мл на 96 лунок	–	1 шт.	–		1 шт.	
Гребенка для глубоколуночного планшета	–	1 шт.	–		1 шт.	
Пакет 2 – 1 шт. в составе:						
Планшет глубоколуночный 2,2 мл на 96 лунок	–	5 шт.	–		5 шт.	
Пакет 3 – 1 шт. в составе:						
Планшет глубоколуночный 0,5 мл на 96 лунок	–	1 шт.	–		1 шт.	
Пакет 4 – 1 шт. в составе:						
Планшет для ПЦР на 96 лунок	–	1 шт.	–		1 шт.	
Пленка для ПЦР планшетов термостойкая	–	1 шт.	–		1 шт.	
Пакет 5 – 1 шт. в составе:						
Пленка клейкая для планшетов с одной насечкой	–	5 шт.	–		5 шт.	

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

Ванночка для реагентов вместимостью 30 мл	–	5 шт.	–	5 шт.

Примечания

1 Паспорт на серию входит в комплект поставки набора реагентов. Число экземпляров паспорта каждой серии, определено в договоре на поставку продукции.

2 Паспорт безопасности предоставляется транспортной компании в количестве – 1 шт. и конечному потребителю при запросе, количество экземпляров, определено в договоре на поставку продукции.

3 Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам, входящим в состав набора реагентов, определена согласно ГОСТ ISO 17511-2011.

4 Для комплекта 2 допускается замена четырех упаковок «Компоненты для выделения. Упаковка 1» из комплекта 2 на четыре упаковки «Компоненты для выделения. Упаковка 1» из комплекта 1.

5 Для комплекта 2 допускается замена четырех упаковок «Расходные материалы. Упаковка 3» из комплекта 2 на четыре упаковки «Расходные материалы. Упаковка 3» из комплекта 1.

3.2 Число анализируемых образцов биологического материала

Набор реагентов предназначен для ручных и автоматических постановок анализа и рассчитан на выполнение 96 тестов (Комплект 1) или 384 тестов (Комплект 2), включая калибраторы и контрольные образцы.

3.3 Принцип метода

Принцип метода основан на количественном определении содержания копий ДНК TREC и KREC и качественном определении присутствия нативного гена SMN1 с использованием процесса амплификации участков ДНК TREC, KREC и SMN1 с помощью специфических к этим участкам праймеров и гибридизационных зондов (флуоресцентно меченные зонды) и Taq ДНК-полимеразы с последующим определением накопления специфического флуоресцентного сигнала на амплификаторе с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

Выявление наличия или отсутствия ДНК TREC, KREC и нативного SMN1 и их количественное определение в анализируемых образцах включает в себя две стадии:

1) выделение ДНК из анализируемых образцов, включающее лизис образцов, сорбцию ДНК на магнитные частицы, отмывки и элюцию;

2) амплификация методом ПЦР-РВ, с использованием специфических праймеров и гибридизационных зондов.

Для контроля анализа в составе ПЦР-смеси предусмотрены праймеры и гибридизационные зонды, специфические для участка гена человека ALB[4] (эндогенный внутренний контроль). Эндогенный внутренний контроль позволяет контролировать этапы выделения нуклеиновых кислот и проведения ПЦР, отсутствие в образце ингибиторов ПЦР, оценивать адекватность взятия и количество материала. С учетом эндогенного контроля происходит пересчет количества копий ДНК TREC и KREC в анализируемом образце.

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

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

4 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

4.1 Диагностическая чувствительность

В ходе клинических испытаний при анализе клинического материала значение диагностической чувствительности (ДЧ) составило 100,0 %

- (интервал 97,3-100,0, с доверительной вероятностью 95,0 %) для 110 образцов, отобранных от пациентов с дефектами Т и В-клеточного звеньев иммунной системы;
- (интервал 95,3-100,0, с доверительной вероятностью 95,0 %) для 62 образцов, отобранных от пациентов с гомозиготной делецией экзона 7 в гене SMN1 хромосомы 5.

4.2 Диагностическая специфичность

В ходе клинических испытаний при анализе клинического материала значение диагностической специфичности (ДС) составило 100,0 %

- (интервал 98,8-100,0, с доверительной вероятностью 95,0 %) для 258 образцов, отобранных от пациентов без дефектов Т и В-клеточного звеньев иммунной системы;
- (интервал 99,0-100,0, с доверительной вероятностью 95,0 %) для 306 образцов, отобранных от пациентов без делеции экзона 7 в гене SMN1.

4.3 Аналитическая специфичность

В наборе реагентов реализованы методики:

1. количественного определения трех генов мишеней: гена ALB (контрольная реакция), TREC, KREC
2. качественное определение отсутствия гомозиготной делеции 7 экзона гена SMN1.

Специфические олигонуклеотидные последовательности с флуоресцентной меткой и без таковой были разработаны таким образом, чтобы избежать любой неспецифической амплификации ДНК, выделенной из цельной крови или сухих пятен крови. Анализ специфичности был проведен *in silico* с использованием базы данных BLAST, который не выявил существенной гомологии с другими генными мишенями.

4.4 Воспроизводимость

Внутрисерийная воспроизводимость анализа была протестирована в ходе клинико-лабораторных испытаний с использованием двенадцати положительных и пятнадцати отрицательных анализируемых образцов (цельная кровь с К2ЭДТА или К3ЭДТА или цитратом натрия или сухое пятно) в 5 повторах на наборах реагентов одной серии.

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

Коэффициент вариации не превысил 10 % для образцов цельной крови и 25 % для образцов сухих пятен крови.

Межсерийная воспроизводимость анализа была протестирована в ходе клинико-лабораторных испытаний с использованием четырнадцати положительных и пятнадцати отрицательных анализируемых образцов (цельная кровь с К2ЭДТА или К3ЭДТА или цитратом натрия или сухое пятно) на 3 сериях набора реагентов. Коэффициент вариации не превысил 10 % для образцов цельной крови и 25 % для образцов сухих пятен крови.

4.5 Предел обнаружения

Предел обнаружения (LOD) набора реагентов с использованием образца от пациента с недостаточность Т-клеточного звена иммунитета составил:

7,0 копий TREC на 100 000 лейкоцитов.

Предел обнаружения (LOD) набора реагентов с использованием образца от пациента с недостаточность В-клеточного звена иммунитета составил:

6,5 копий KREC на 100 000 лейкоцитов.

4.6 Линейный диапазон

Линейный диапазон количественного определения копийности TREC, KREC и ALB, определенный с помощью калибраторов «К1», «К2», «К3», «К4» составляет от $1x10^3$ до $1,3x10^7$ копий/мл.

4.7 Интерферирующие вещества

При выделении нуклеиновых кислот (далее по тексту – НК) из образцов цельной крови человека и сухих пятен крови человека гемоглобин (до 160 мг/мл), триглицериды (до 50 мг/дл), общий билирубин (до 60 мг/дл) не влияют на результат анализа.

Гуанидин хлорид (до 50 мМ), гуанидин тиоцианат (до 50 мМ), мочевина (до 50 мМ), этиловый спирт (до 5 %), изопропиловый спирт (до 5 %) – вещества, которые могут попадать в образец при выделении НК из образца цельной крови или сухого пятна не влияют на результат анализа.

4.8 Чувствительность

Чувствительность набора реагентов по SMN1 при контроле на положительном образце (СКО №5) панели стандартных контрольных образцов «СКО ДНК(+/-) TREC/KREC/ALB/SMN1», аттестованной ОБТК предприятия, должна быть 100 % без ложноотрицательных результатов.

4.9 Специфичность

Специфичность набора реагентов по SMN1 при контроле на отрицательных образцах (СКО №№1-4) панели стандартных контрольных образцов «СКО ДНК(+/-)

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

TREC/KREC/ALB/SMN1», аттестованной ОБТК предприятия, должна быть 100 % без ложноположительных результатов.

4.10 Точность измерения

Точность измерения в ходе дополнительных технических испытаний была оценена на образцах панели стандартных контрольных образцов «СКО ДНК(+/-) TREC/KREC/ALB/SMN1», аттестованной ОБТК предприятия. Точность измерения – достаточная.

4.11 Правильность измерения

Правильность измерения в ходе дополнительных технических испытаний была оценена на образцах панели стандартных контрольных образцов «СКО ДНК(+/-) TREC/KREC/ALB/SMN1», аттестованной ОБТК предприятия. Правильность измерения – достаточная.

5 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 2б (Приказ Минздрава России от 06.06.2012 N 4н).

При работе с набором реагентов соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и с использованием методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» и СП 2.1.3678-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к эксплуатации помещений, зданий, сооружений, оборудования и транспорта, а также условиям деятельности хозяйствующих субъектов, осуществляющих продажу товаров, выполнение работ или оказание услуг».

К работе с набором реагентов допускают специально обученный персонал, прошедший дополнительное профессиональное обучение правилам безопасной работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и молекулярно-генетическим методам.

Компоненты набора реагентов «ПЛ», «ЛБ», «ПР», «ЭР», содержат в качестве консерванта не более 0,15 % проклина 300. Компоненты набора реагентов «5хПЦР буфер», «ПЦР-смесь», содержат в качестве консерванта не более 0,1 % проклина 300.

Изопропанол, входящий в состав компонентов «РП» и «ПР» обладает раздражающим действием. Следует избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. Использо-

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

вать только в хорошо вентилируемом помещении! Избегать разбрызгивания, вдыхания, проглатывания и попадания компонента на кожу, слизистые и в глаза! Беречь от источников воспламенения / нагревания / искр / открытого огня! При пожаре тушить огнетушителями на основе диоксида углерода, порошковым средством для тушения или водяной струей мелкого разбрызгивания. При борьбе с крупными пожарами применять водяную струю мелкого разбрызгивания или спиртоустойчивую пену. Полноструйная вода НЕ пригодна для тушения!

Гуанидин тиоцианат, входящий с состав компонентов «ПЛ» и «ЛБ» обладает раздражающим действием. Следует избегать разбрызгивания и попадания их на кожу и слизистые.

При проглатывании компонентов набора реагентов прополоскать полость рта, обратиться за медицинской помощью при плохом самочувствии. НЕ вызывать рвоту! При вдыхании компонентов набора реагентов выйти на свежий воздух, обратиться за медицинской помощью при плохом самочувствии. При попадании компонентов набора реагентов на кожу и/или одежду немедленно снять всю загрязненную одежду, промыть кожу проточной водой, обратиться за медицинской помощью при плохом самочувствии. При попадании компонентов набора реагентов в глаза осторожно промыть глаза проточной водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы (при наличии), если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. Немедленно обратиться за медицинской помощью!

Все реактивы, входящие в состав компонентов набора реагентов в используемых концентрациях, являются нетоксичными. При попадании данных растворов на кожу и слизистые промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

Все использованные материалы, инструменты и оборудование, рабочее место дезинфицировать в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 и МУ 287-113.

Обеззараживание и/или обезвреживание и утилизацию всех анализируемых образцов, компонентов и отходов набора реагентов, несущих потенциальную биологическую опасность, производить в соответствии с разделом «Утилизация набора реагентов» настоящей инструкции по применению. При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

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

6 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, ПРЕДУСМОТРЕННЫЕ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КОМБИНАЦИИ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

6.1 При ручной постановке анализа необходимо нижеперечисленное оборудование и материалы:

– специальный автоматический или ручной перфоратор для выбивания дисков из сухих пятен крови;

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (далее по тексту - амплификатор): «CFX96» («Bio-Rad», США, РУ ФСЗ 2008/03399) или «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ ФСР 2011/10229);

– бокс абактериальной воздушной среды 2-го класса биологической защиты;

– морозильная камера, поддерживающая температуру от минус 24 до минус 16 °С или холодильник с морозильной камерой, поддерживающий температуру от минус 24 до минус 16 °С.

– микроцентрифуга;

– термостат или термостатирующий шейкер, поддерживающие температуру (80 ± 1) °С;

– встряхиватель для пробирок, типа Vortex (далее по тексту - вортекс);

– одноканальные полуавтоматические дозаторы пипеточные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 1 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов, погрешность измерения которых должна быть не более 3 %;

– штативы для микропробирок вместимостью 0,2 и 2,0 мл;

– контейнер для сбора и обеззараживания наконечников;

– средства индивидуальной защиты (блузон, брюки, халат, шапочку, тапочки или сабо, очки защитные, полумаску, одноразовые перчатки, нарукавники одноразовые);

– одноразовые наконечники для полуавтоматических одноканальных дозаторов пипеточных с аэрозольным барьером;

– пробирки одноразовые полипропиленовые вместимостью 1,5 – 2,0 мл;

– тонкостенные микропробирки, стрипы или планшеты для ПЦР, пленка для ПЦР-планшетов, рекомендуемые производителем амплификатора для ПЦР-РВ («Планшет для ПЦР на 96 лунок» и «Пленка для ПЦР планшетов термостойкая» входят в состав набора реагентов, Вариант 2);

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

– планшеты глубоколуночные («Планшет глубоколуночный 2,2 мл на 96 лунок» и «Планшет глубоколуночный 0,5 мл на 96 лунок» входят в состав набора реагентов, Вариант 2);

– пленка клейкая для планшетов («Пленка клейкая для планшетов с одной насечкой» входит в состав набора реагентов, Вариант 2);

– ванночки для реагентов («Ванночка для реагентов вместимостью 30 мл», входит в состав набора реагентов, Вариант 2);

– магнитный штатив или магнитный стержень.

6.2 При постановке анализа на автоматической станции необходимо:

– специальный автоматический или ручной перфоратор для выбивания дисков из сухих пятен;

– автоматическая станция для выделения нуклеиновых кислот с принадлежностями для ПЦР исследований: процессор магнитных частиц для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков KingFisher Flex, производства «Термо Фишер Сайентифик Ой», Финляндия (РУ ФСЗ 2009/05562)система для автоматического выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологического материала AutoPure 96, производства ООО «Ханьчжоуская компания инструментов» Китай, (РУ РЗН 2022/16430);

– станция для раскапывания: станция дозирующая автоматическая Microlab STARlet с принадлежностями производства «Гамильтон Бонадуц АГ», Швейцария (РУ РЗН 2018/6981) -;

– амплификатор: «CFX96» («Bio-Rad», США, РУ ФСЗ 2008/03399) или «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ ФСР 2011/10229);

– бокс абактериальной воздушной среды 2-го класса биологической защиты;

– морозильная камера, поддерживающая температуру от минус 24 до минус 16 °С или холодильник с морозильной камерой, поддерживающей температуру от минус 24 до минус 16 °С.

– микроцентрифуга;

– термостат или термостатирующий шейкер, поддерживающие температуру (80 ± 1) °С;

– вортекс;

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

– одноканальные полуавтоматические дозаторы пипеточные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 1 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов, погрешность измерения которых должна быть не более 3 %;

– штативы для микропробирок вместимостью 0,2 и 2,0 мл;

– контейнер для сбора и обеззараживания наконечников;

– средства индивидуальной защиты (блузон, брюки, халат, шапочку, тапочки или сабо, очки защитные, полумаску, одноразовые перчатки, нарукавники одноразовые);

– одноразовые наконечники для полуавтоматических одноканальных дозаторов пипеточных с аэрозольным барьером;

– пробирки одноразовые полипропиленовые вместимостью 1,5 – 2,0 мл;

– тонкостенные микропробирки, стрипы или планшеты для ПЦР, пленка для ПЦР-планшетов, рекомендуемые производителем амплификатора для ПЦР-РВ («Планшет для ПЦР на 96 лунок» и «Пленка для ПЦР планшетов термостойкая» входят в состав набора реагентов, Вариант 2);

– планшеты глубоколуночные, гребенки к планшетам глубоколуночным («Планшет глубоколуночный 2,2 мл на 96 лунок», «Гребенка для глубоколуночного планшета» и «Планшет глубоколуночный 0,5 мл на 96 лунок» входят в состав набора реагентов, Вариант 2);

– пленка клейкая для планшетов («Пленка клейкая для планшетов с одной насечкой» входит в состав набора реагентов, Вариант 2);

– ванночки для реагентов («Ванночка для реагентов вместимостью 30 мл», входит в состав набора реагентов, Вариант 2).

7 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Идентификацию и прослеживаемость анализируемых образцов проводить в соответствии с системой менеджмента качества лаборатории.

ВНИМАНИЕ! Выделять НК из образцов цельной крови или сухих пятен крови человека необходимо только с помощью «Компонентов для выделения. Упаковка 1», входящих в состав набора реагентов.

Забор цельной крови производить одноразовой иглой в специальную вакуумную систему (К2ЭДТА, К3ЭДТА или натрия цитратом 3,8 %). Пробирку аккуратно перевернуть несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом.

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

ВНИМАНИЕ! Образцы цельной крови НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ!

Антикоагулянты: К2ЭДТА, К3ЭДТА и цитрат натрия человека не влияют на результаты анализа.

ВНИМАНИЕ! НЕЛЬЗЯ использовать для забора крови вакуумные системы, содержащие в качестве антикоагулянта соли гепарина!

В соответствии с «МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», перед выделением НК образцы цельной крови могут храниться и транспортироваться:

- в течение 48 часов при температуре от 2 до 8 °С или

- в течение 8 часов при температуре от 20 до 25 °С.

После хранения образцов нужно их доводить до комнатной температуры и переворачивать 3-6 кратным переворачиванием пробирки для перемешивания.

Сухие пятна крови человека (далее по тексту - СПК) могут транспортироваться в условиях температуры окружающей среды, избегая попадания влаги, и храниться в сухом месте при комнатной температуре в течение 24 месяцев.

Для приготовления СПК используют капли крови, взятые обычным образом из пятки у новорожденных или пункцией вены у детей и взрослых, которые наносят на тест бланк. Пятна цельной крови высушивают на воздухе согласно инструкции производителя тест-бланков.

Для выделения НК из цельной крови необходимо 100 мкл биологического образца.

Для выделения НК из СПК необходимо выбить 1 панч диаметром 6 мм или 3 панча диаметром по 3,2 мм.

Выделенные образцы НК из образцов цельной крови или СПК допускается хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 48 часов, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 месяцев и при температуре ниже минус 65 °С в течение года. Для хранения НК необходимо, не захватывая магнитные частицы, перенести надосадочную жидкость после выделения НК в новую чистую пробирку имеющую специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Объем образцов НК, выделенных из цельной крови или СПК, необходимый для проведения анализа ПЦР-РВ составляет 10 мкл.

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

8 ОЖИДАЕМЫЕ И ПРЕДСКАЗУЕМЫЕ ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ, СВЯЗАННЫЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Побочные эффекты, связанные с применением набора реагентов, такие как получение ложноположительных и ложноотрицательных результатов могут наблюдаться в следующих случаях:

Использование компонентов с истекшим сроком годности.

Использование «Компонентов для выделения. Упаковка 1» и «Компонентов для ПЦР-РВ. Упаковка 2», и «Расходные материалы. Упаковка 3» из наборов реагентов разных серий или смешивание их в процессе приготовления растворов.

Использование компонентов из наборов реагентов других производителей наборов реагентов.

Несоблюдение условий и сроков хранения вскрытых компонентов в случае частичной постановки.

Использование для приготовления растворов грязной посуды.

Несоблюдение условий хранения анализируемых образцов, которое может привести к разрушению аналита или появлению в анализируемом образце веществ, искажающих результат анализа.

Неправильное дозирование растворов, которое приводит как к росту, так и к снижению регистрируемой флуоресценции.

Изменение концентрации раствора за счет испарения жидкости из открытого флакона с компонентом.

Использование оборудования, не прошедшего регламентированного периодического технического обслуживания и/или эксплуатирующегося не в соответствии с инструкцией по применению на данное оборудование.

Использование для работы с компонентами, анализируемыми и контрольными образцами грязных наконечников.

Внесение анализируемых образцов одним наконечником.

Использование для дезинфекции посуды, оборудования, материалов и рабочих поверхностей неразрешенных и/или оказывающих влияния на результат ПЦР-РВ дезинфицирующих средств. Рекомендуется использовать, например, дезсредства: хлорамин и другие хлорсодержащие средства.

Рекомендуется использовать неопудренные перчатки и одноразовые нарукавники.

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

9 ПОДГОТОВКА «КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ. УПАКОВКА 1» НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Для выделения НК из цельной крови человека или СПК человека использовать «Компоненты для выделения. Упаковка 1», входящие в состав набора реагентов.

Извлечь из коробки набора реагентов «ПЛ», «ЛБ», «РП», «ПР», и «ЭР», проверить целостность упаковки и срок годности каждого компонента набора реагентов. При обнаружении повреждения или при истечении срока годности компоненты набора реагентов следует обработать в соответствии с разделом «Утилизация набора реагентов» настоящей инструкции по применению. Перед применением все вышеперечисленные компоненты инкубировать при комнатной температуре (от 15 до 25 °С) в течение 15 мин., затем аккуратно перемешать содержимое флаконов.

ВНИМАНИЕ! При наличии во флаконах с компонентами «ПЛ» и «ЛБ» кристаллического осадка или хлопьев необходимо прогреть их содержимое при 65 °С до полного растворения осадка.

Хранение: неиспользованные и вскрытые компоненты «ПЛ», «ЛБ», «ПР», «РП», «ЭР», хранить при температуре от 2 до 25 °С в течение срока годности набора реагентов.

10 ВЫДЕЛЕНИЕ НК ИЗ ОБРАЗЦОВ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ИЛИ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

ВНИМАНИЕ! *При работе с биоматериалами необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free. Для проведения всех манипуляций использовать одноразовые наконечники с фильтрами.*

10.1 Ручная методика выделения НК

10.1.1 Предварительная подготовка образцов цельной крови человека

10.1.1.1 Промаркировать по одной одноразовой пластиковой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого образца цельной крови человека.

10.1.1.2 Перемешать образцы цельной крови человека вручную, переворачивая пробирку 8-10 раз.

10.1.1.3 Перемешать «ПЛ» вручную, вращая флакон между ладонями в течение 20 сек.

10.1.1.4 В промаркированные пробирки добавить по 100 мкл «ПЛ».

10.1.1.5 Добавить по 100 мкл образцов крови человека в пробирки и перемешать содержимое на вортексе 3 сек.

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

10.1.2 Предварительная подготовка образцов СПК

10.1.2.1 Промаркировать по одной одноразовой пластиковой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого образца СПК.

10.1.2.2 Из центральной части сухого пятна с образцом крови человека выбить с помощью специального пробойника 1 панч диаметром 6 мм или 3 панча диаметром по 3,2 мм и поместить его (их) в промаркированную пробирку. Рекомендуется проводить данную процедуру непосредственно перед процедурой выделения НК из СПК.

10.1.2.3 В пробирки с выбитыми дисками добавить по 200 мкл «ПЛ».

10.1.2.4 Инкубировать пробирки в твердотельном термостате при температуре 75 °С в течение 20 минут. Перемешать содержимое на вортексе 3 сек каждые 5 минут.

ВНИМАНИЕ! Избегать интенсивного перемешивания для предотвращения разрушения бумажной основы диска.

ВНИМАНИЕ! Диск сухого пятна крови должен постоянно находиться в «ПЛ». После инкубации центрифугировать пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 5 сек на максимальном количестве оборотов.

10.1.2.5 Отобрать полностью надосадочную жидкость в чистые промаркированные пробирки, не упираясь наконечником в диски и не захватывая бумажную основу.

10.1.3 Процедура экстракции НК

ВНИМАНИЕ! Необходимо периодически встряхивать «ЛБ» для перемешивания магнитных частиц во время разнесения его по пробиркам.

ВНИМАНИЕ! При выполнении процедуры по пп. 10.1.3.1-10.1.3.7 рекомендуется открывать крышку только той пробирки, с которой идет работа, и сразу закрывать её после проведения манипуляции. НЕ открывать сразу несколько пробирок, для исключения контаминации!

10.1.3.1 В пробирку с **предварительно** подготовленным образцом (цельной крови человека (п. 10.1.1.5) или сухим пятном крови человека (п. 10.1.2.5)) внести 250 мкл «ЛБ» перемешать пипетированием, затем 450 мкл «РП», перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 3 сек.

ВНИМАНИЕ! Нельзя использовать цельную кровь и сухое пятно крови без предварительной подготовки.

ВНИМАНИЕ! Обязательно использовать отдельный одноразовый наконечник для каждой манипуляции, чтобы исключить контаминацию компонентов «ЛБ» и «РП».

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

10.1.3.2 Инкубировать пробирки в твердотельном термостате при температуре 75 °С в течение 10 минут. Перемешивать содержимое на вортексе 3 сек каждые 3 минуты.

10.1.3.3 После инкубации перемешать образцы на вортексе в течение 5 сек и осадить капли на миницентрифуге на максимальном количестве оборотов.

10.1.3.4 Поместить пробирки в магнитный штатив, выдержать 1-2 минуты, затем отобрать надосадочную жидкость из пробирок с помощью вакуумного отсасывателя или пипеточного дозатора, не задевая магнитных частиц.

ВНИМАНИЕ! Держать пробирки в магнитном штативе при удалении надосадочной жидкости. Использовать отдельный одноразовый наконечник с аэрозольным барьером (при использовании пипеточного дозатора) или без такового (при использовании вакуумного отсасывателя) для каждого анализируемого образца.

ВНИМАНИЕ! При добавлении раствора, пробирки не вынимать из магнитного штатива! На каждом этапе необходимо убедиться, что магнитные частицы все время остаются смоченными растворами.

НЕ ДОПУСКАТЬ высыхания магнитных частиц!

10.1.3.5 Внести по 750 мкл «ПР» в каждую пробирку.

10.1.3.6 Закрыть пробирки, перемешать содержимое пробирок переворачиванием магнитного штатива 8-10 раз. НЕ ВЫНИМАТЬ ПРОБИРКИ ИЗ МАГНИТНОГО ШТАТИВА! Отобрать надосадочную жидкость пипеточным дозатором или вакуумным отсасывателем из пробирок и с крышек пробирок, не задевая магнитных частиц, и держа пробирки в магнитном штативе.

10.1.3.7 Повторить процедуру отмывки магнитных частиц по пп. 10.1.3.5-10.1.3.6 еще два раза.

Общее количество отмывок – 3.

10.1.3.8 Открыть пробирки и подсушить осадок магнитных частиц в твердотельном термостате при температуре 75 °С в течение 5 минут.

10.1.3.9 Не вынимая пробирки из твердотельного термостата добавить на дно пробирок по 60 мкл «ЭР». Закрыть крышки пробирок.

10.1.3.10 Проверить, что «ЭР» полностью покрывает магнитные частицы, иначе аккуратно перемешать в течение 1-3 секунд на вортексе.

10.1.3.11 Инкубировать пробирки в твердотельном термостате при температуре 75 °С в течение 10 минут. Перемешивать содержимое на вортексе по 3 сек каждые 3 минуты.

10.1.3.12 После инкубации перемешать образцы на вортексе в течение 5 сек и осадить капли на миницентрифуге на максимальном количестве оборотов.

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

10.1.3.13Образцы выделенных НК готовы для постановки ПЦР анализа.

10.1.3.14Перед внесением в реакционную смесь пробирки с образцами выделенных НК необходимо поставить на магнитный штатив.

ВНИМАНИЕ! Отбирать образец выделенной НК для постановки ПЦР анализа необходимо аккуратно, избегая попадания магнитных частиц в наконечник пипеточного дозатора.

Образцы выделенных НК могут храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение 48 часов, при минус 20 °С в течение 30 дней, при температуре ниже минус 65°С в течение года. Для хранения НК необходимо, не захватывая магнитные частицы, перенести надосадочную жидкость после выделения НК в новую чистую пробирку имеющую специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

10.2 Методика выделения НК с использованием автоматических станций с магнитной головкой

10.2.1 Предварительная подготовка образцов цельной крови человека

10.3.1.1 Предварительную подготовку образцов цельной крови человека проводить в соответствии с п. 10.1.1 данной Инструкции по применению.

10.2.2 Предварительная подготовка образцов СПК

10.2.2.1 Из центральной части сухого пятна с образцом крови человека выбить с помощью специального пробойника 1 панч диаметром 6 мм или 3 панча диаметром 3,2 мм в «Планшет глубоколуночный 0,5 мл на 96 лунок».

10.2.2.2 В лунки планшета с выбитыми дисками добавить по 200 мкл «ПЛ».

10.2.2.3 В автоматическую станцию с магнитной головкой в слот 1 поставить планшет с гребенкой, в слот 8 поставить планшет с выбитыми пятнами в растворе «ПЛ».

10.2.2.4 Запустить программу инкубации при температуре 75 °С в течение 20 минут и небольшом перемешивании 3 сек каждые 5 минут.

10.2.3 Подготовка к проведению процедуры выделения НК

10.2.3.1 Приготовить и промаркировать пять глубоколуночных планшетов: «Образец», «ПР 1», «ПР 2», «ПР 3» и «ЭР».

10.2.3.2. Внести в каждую лунку соответствующих глубоколуночных планшетов:

- В планшеты «ПР 1», «ПР 2», «ПР 3» - по 750 мкл «ПР»;
- В планшет «ЭР» - по 60 мкл «ЭР»;

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

• В планшет «Образец» - по 250 мкл «ЛБ», потом по 150 мкл или весь объем предварительно подготовленных анализируемых образцов (по п. 10.3.1.1 или п. 10.3.2.4), перемешать пипетированием, и по 450 мкл «РП».

ВНИМАНИЕ! При наличии в «ЛБ» кристаллического осадка или хлопьев необходимо инкубировать флакон с «ЛБ» при 65 °С до полного растворения осадка.

ВНИМАНИЕ! Необходимо периодически встряхивать «ЛБ» для перемешивания магнитных частиц во время разнесения его по лункам планшета.

10.2.3.2 Поместить новую насадку на магнитную головку (далее по тексту – МГ) в планшет для хранения насадки. Поместить все планшеты в автоматическую станцию согласно протоколу.

10.2.4 Процедура экстракции НК

10.2.4.1 Инкубировать планшет «Образец» при температуре **75 °С** в течение **10 мин**, при постоянном аккуратном перемешивании (скорость 1,5 из 10).

10.2.4.2 Поместить МГ в планшет «Образец» на **2 мин.**

10.2.4.3 Переместить МГ с магнитными частицами в планшет **«ПР 1»**, перемешать содержимое в течении 1,5 мин.

10.2.4.4 Переместить МГ с магнитными частицами в планшет **«ПР 2»**, перемешать содержимое в течении 1,5 мин.

10.2.4.5 Переместить МГ с магнитными частицами в планшет **«ПР 3»**, перемешать содержимое в течении 1,5 мин.

10.2.4.6 Переместить МГ с магнитными частицами в планшет **«ЭР»**.

10.2.4.7 Инкубировать планшет при температуре **75 °С** в течение **7,5 мин** при постоянном аккуратном перемешивании (скорость 1,5 из 10).

10.2.4.8 Удалить МГ с магнитными частицами.

10.2.4.9 Содержимое лунок планшета «ЭР» содержит выделенные образцы НК.

10.2.4.10 Образцы выделенных НК готовы для постановки ПЦР анализа.

10.2.4.11 Образцы выделенных НК могут храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение 48 часов, при минус 20 °С в течение 30 дней, при температуре ниже минус 65°С в течение года.

11 ПОДГОТОВКА ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ПЦР-РВ

Для проведения анализа ПЦР-РВ с помощью «Компонентов для ПЦР-РВ. Упаковка 2» с использованием амплификатора, необходимо его подготовить **заранее** в соответствии с руководством по эксплуатации.

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

12 ПОДГОТОВКА «КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ ПЦР-РВ. УПАКОВКА 2» НАБОРА РЕАГЕНТОВ

12.1 Подготовка «ПЦР-смесь», «5×ПЦР-буфер», «К1», «К2», «К3», «К4», «ПКО» и «ОКО»

«5×ПЦР-буфер», «ПЦР-смесь», «К1», «К2», «К3», «К4», «ПКО» и «ОКО» готовы к использованию.

Перед применением все растворы необходимо разморозить при комнатной температуре, аккуратно перемешать и осадить капли с крышки пробирки кратким центрифугированием в течение 1-3 сек.

Хранение: неиспользованные и вскрытые компоненты «5×ПЦР-буфер», «ПЦР-смесь», «К1», «К2», «К3», «К4», «ПКО» и «ОКО» хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение срока годности набора реагентов.

12.2 Подготовка «*Taq*-полимераза»

«*Taq*-полимераза» готова к использованию.

Перед применением аккуратно перемешать и осадить капли с крышки пробирки кратким центрифугированием в течение 1-3 секунд.

ВНИМАНИЕ! «Taq-полимераза» не требует размораживания, пробирку хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. При приготовлении реакционной смеси добавлять «Taq-полимеразу» в последнюю очередь. Длительное хранение при комнатной температуре критически влияет на активность фермента.

Хранение: неиспользованные и вскрытые компоненты «Taq-полимераза» хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение срока годности набора реагентов.

13 ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-РВ

13.1 Подготовка микропробирок или планшетов для амплификации

ВНИМАНИЕ! При работе с НК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free. Для внесения в пробирки/лунки планшета реагентов, проб НК, калибраторов и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами	
ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования	
Подготовка микропробирок/ планшета ПЦР	Расчет количества микропробирок (N) или лунок планшета производится по формуле: N= **n** + 6, где **n** – количество выделенных анализируемых образцов, 6 – калибраторы, положительный и отрицательный контрольные образцы (6 шт.) – «К1», «К2», «К3», «К4», «ПКО» и «ОКО». При необходимости калибраторы, отрицательный и положительный контрольные образцы можно поставить в двух повторах: Тогда N = **n** + 12, где **n** – количество выделенных анализируемых образцов,

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

<table>
<tr><td></td><td>12 – калибраторы, отрицательный и положительный контрольные образцы в двух повторах каждый – 2 х «К1», 2 х «К2», 2 х «К3», 2 х «К4», 2 х «ПКО» и 2 х «ОКО».
В случае использования микропробирок отобрать необходимое для проведения анализа число пробирок или стрипованных пробирок, промаркировать и расположить в штативе.</td></tr>
<tr><td colspan="2">ВНИМАНИЕ! В зависимости от используемого оборудования для проведения ПЦР-РВ надписи на пробирках следует располагать таким образом, чтобы они не мешали детектированию флуоресцентного сигнала. См. руководство по использованию амплификатора для проведения ПЦР-РВ.</td></tr>
<tr><td>Приготовление реакционной смеси</td><td>В пробирке объемом 1,5 - 2 мл смешать реагенты для приготовления реакционной смеси из расчета на необходимое количество микропробирок/лунок планшета N, согласно приведенной ниже таблице.
<table>
<tr><td>Название реагента</td><td>Объем реагента на одну реакцию (микропробирку/лунку)</td><td>Объем реагента для анализа N микропробирок/лунок (с учётом 10% запаса объема)</td></tr>
<tr><td>«5×ПЦР-буфер»</td><td>5 мкл</td><td>5×N×1,1 мкл</td></tr>
<tr><td>«ПЦР-смесь»</td><td>9 мкл</td><td>9×N×1,1 мкл</td></tr>
<tr><td>«Taq-полимераза»</td><td>1 мкл</td><td>1×N×1,1 мкл</td></tr>
</table>
Перемешать приготовленную реакционную смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратким центрифугированием (1-3 с).</td></tr>
<tr><td>Внесение реакционной смеси*</td><td>В каждую микропробирку/лунку планшета внести по 15 мкл реакционной смеси.</td></tr>
<tr><td>Внесение образцов в пробирки/лунки планшета с реакционной смесью*</td><td>Внесение образцов в пробирки/лунки планшета с реакционной смесью необходимо осуществлять в следующей последовательности (для исключения контаминации):
1. 10 мкл «ОКО»
2. по 10 мкл выделенных образцов НК
3. 10 мкл «К4»
4. 10 мкл «К3»
5. 10 мкл «К2»
6. 10 мкл «К1»
7. 10 мкл «ПКО»
Перед внесением калибраторов, отрицательного и положительного контрольных образцов, перемешивать содержимое пробирок пипетированием.

Планшет заклеить пленкой для ПЦР. Осадить капли со стенок ПЦР-планшета кратким центрифугированием.
В случае использования микропробирок закрыть крышки. Перед постановкой в амплификатор рекомендуется осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием (1-3 с).

При постановке калибраторов, отрицательного и положительного контрольных образцов в двух повторах п.п. 1, 3-7 выполнить в двух повторах без внесения изменения последовательности внесения образцов в лунки плашки или микропробирки.</td></tr>
<tr><td>Регистрация результатов анализа</td><td>Выполнить в соответствии с «Процедурой измерения и оценки результата»</td></tr>
</table>

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

*Внесение реакционной смеси и образцов в лунки планшета можно производить на автоматической дозирующей станции. Для этого необходимо запрограммировать внесение реакционной смеси и образцов (при необходимости обратиться в компанию, обслуживающую автоматическую дозирующую станцию).

13.2 Процедура измерения и оценка результата

Ввести в прибор для ПЦР-РВ программу проведения амплификации и детекции флуоресцентных сигналов:

Количество циклов	Температура (℃)	Время	Измерение флуоресценции в каналах
1	95	15 мин	-
5	95	10 с	-
	60	30 с	-
	72	15 с	-
40	95	10 с	-
	60	30 с	**FAM**/Green, **R6G**/JOE/HEX/VIC/Yellow **ROX**/Orange **Cy5**/Red
	72	15 с	-

Для детектирования сигнала при амплификации ДНК TREC, KREC и нативного SMN1 (без делеции 7 экзона) в наборе реагентов используются гибридизационные зонды, меченные, соответственно, флюорофорами ROX, R6G и Cy5 соответственно. Для детектирования сигнала при амплификации ALB (эндогенный внутренний контроль) в системе используется гибридизационный зонд, меченный флюорофором FAM. Для детекции следует выбирать четыре канала детекции **FAM**/Green, **HEX**/R6G/JOE/VIC/Yellow, **ROX**/Orange и **Cy5**/Red**.**

Канал детекции	**FAM**/Green	**HEX**/R6G/JOE/VIC/Yellow	**ROX**/Orange	**Cy5**/Red
Мишень	ALB	KREC	TREC	SMN1

Запрограммировать положение пробирок с калибраторами, отрицательным контрольным образцом, положительным контрольным образцом, анализируемыми образцами согласно инструкциям по эксплуатации к соответствующему амплификатору для ПЦР-РВ, задать значения концентраций для каналов FAM/Green, HEX/R6G/JOE/VIC/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red (в зависимости от используемого прибора) «К1», «К2», «К3» и «К4», указанные в приложении к паспорту набора реагентов. Концентрации TREC, KREC и ALB для анализируемых образцов будут высчитаны автоматически прибором.

Поместить пробирки или планшет в амплификатор.

Запустить программу и провести ПЦР-РВ с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

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

14 РАСЧЕТЫ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР-РВ в соответствии с инструкцией к прибору.

14.1 Условия правильности работы набора реагентов

В калибраторах прибор должен фиксировать:

– нарастание сигнала флуоресценции в канале **ROX** и определять значение порогового цикла Ct в канале **ROX**;

– нарастание сигнала флуоресценции в канале **HEX** и определять значение порогового цикла Ct в канале **HEX**;

– нарастание сигнала флуоресценции в канале **FAM** и определять значение порогового цикла Ct в канале **FAM**.

В положительном контрольном образце прибор должен фиксировать:

– нарастание сигнала флуоресценции в канале **ROX** и определять значение порогового цикла Ct в канале **ROX**;

– нарастание сигнала флуоресценции в канале **HEX** и определять значение порогового цикла Ct в канале **HEX**;

– нарастание сигнала флуоресценции в канале **Cy5** и определять значение порогового цикла Ct в канале **Cy5**;

– нарастание сигнала флуоресценции в канале **FAM** и определять значение порогового цикла Ct в канале **FAM**.

В отрицательном контрольном образце прибор **НЕ** должен фиксировать:

– нарастание сигнала флуоресценции в канале **ROX** и определять Ct в канале **ROX**;

– нарастание сигнала флуоресценции в канале **HEX** и определять Ct в канале **HEX**;

– нарастание сигнала флуоресценции в канале **Cy5** и определять Ct в канале **Cy5**;

– нарастание сигнала флуоресценции в канале **FAM** и определять Ct в канале **FAM**.

В каждом анализируемом образце прибор должен фиксировать:

– нарастание сигнала флуоресценции в канале **FAM** и определять Ct в канале **FAM**.

14.2 Учет результатов анализа

На основании значений порогового цикла Ct (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией) и исходя из заданных значений калибраторов («К1», «К2», «К3», «К4»)[4] происходит автоматическое построение

[4] Значения концентрации калибраторов и значения Ct указаны в Паспорте.

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

калибровочной прямой и расчет значений копий TREC, KREC и ALB в образце для анализа ПЦР (см. руководство к соответствующему амплификатору для ПЦР-РВ). Для SMN1 расчет значения копий не производится, результат учитывают в виде значения порогового цикла Ct.

Алгоритм установления Threshold для прибора «**CFX96»**

- установить пороговую линию по каналу FAM на уровне ~5% от максимального уровня сигнала калибраторов, но без пересечения кривых базовой линии (т.е. не ниже любых выбросов флюоресценции);
- убедиться, что эффективность амплификации и R^2 соответствуют условию регистрации результата;
- установить одинаковый с FAM уровень пороговой линии для канала Cy5;
- убедиться, что пороговая линия по Cy5 не пересекает кривых базовой линии (т.е. не ниже любых выбросов флюоресценции).

Алгоритм установления Threshold для амплификатора «**ДТпрайм»**:

- для расчета Ct необходимо переключиться в режим «расчет по пороговой линии» с режима «геометрический», затем программа выставит уровни пороговой линии в автоматическом режиме
- убедиться, что пороговая линия по Cy5 и FAM находятся на одном уровне.

14.3 Условия регистрации результатов:

14.3.1 Для «ОКО»:

– значение Ct в каналах **FAM, HEX, ROX** и **Cy5** должно быть более 39 циклов или не определяться;

– если значение Ct в каналах **FAM** и/или **HEX** и/или **ROX** и/или **Cy5** меньше или равно 39, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР-РВ считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ.

14.3.2 Для «ПКО»:

– значение Ct в каналах **FAM, HEX, ROX** и **Cy5** должно быть менее 36 циклов.

14.3.3 Для калибраторов «К1», «К2», «К3» и «К4»:

– полученные значения Ct, должны укладываться в диапазон значений, приведенный в приложении к паспорту набора реагентов;

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

– эффективность амплификации должна находиться в пределах от 95 до 105%, а коэффициент корреляции R^2 – не меньше 0,97;

– в случае если значение Ct не укладываются в диапазон значений, приведенный в приложении к паспорту набора реагентов, результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР-РВ считаются недостоверными. Требуется перестановка ПЦР для всех проб;

– если коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной кривой меньше 0,97 требуется перестановка ПЦР для всех проб.

14.3.4 Концентрация ДНК ALB должна быть более 10^5 копии/мл в анализируемых образцах. В случае, если концентрация ДНК ALB менее 10^5 копии/мл в анализируемых образцах, требуется повторить анализ начиная с этапа выделения ДНК из цельной крови/СПК человека.

14.4 Интерпретация результатов анализа

14.4.1 ИДС:

Необходимо рассчитать количество копий TREC (KREC) на 10^5 ядер-содержащих клеток (лейкоцитов) с учетом внутреннего контроля ALB по формуле 1:

$$\textbf{Кол-во TREC (KREC)} = \frac{\text{кол–во копий } \textbf{TREC (KREC)} \text{ на мл}}{\text{кол–во копий } \textbf{ALB}} * 200\,000 \qquad (1)$$

Референсные значения для разных возрастных групп приведены в приложении к паспорту.

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ ОТСУТСТВУЮТ (ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗИРУЕМЫЙ ОБРАЗЕЦ), ЕСЛИ:

- значение TREC (KREC), рассчитанное по формуле 1, равно или более граничного референсного значения возрастной группы, внутри которой находится пациент, сдавший цельную кровь/СПК человека.

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ ПРИСУТСТВУЮТ (ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗИРУЕМЫЙ ОБРАЗЕЦ), ЕСЛИ:

- Ct анализируемого образца не определяется;

- значение TREC (KREC), рассчитанное по формуле 1, менее граничного референсного значения возрастной группы, внутри которой находится пациент, сдавший цельную кровь/СПК человека.

ГРУППА РИСКА ПО ВОЗНИКНОВЕНИЮ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ (ДЛЯ КАТЕГОРИИ «НОВОРОЖДЕННЫЕ»), ЕСЛИ:

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

- значение TREC (KREC), рассчитанное по формуле 1, входит в диапазон граничных референсных значений для категории новорожденных (цельная кровь/СПК человека), требующих наблюдения у врача.

– 14.4.2 СМА:

Для амплификатора «ДТпрайм»:

Результат в канале FAM (ALB)	**Результат в канале Cy5 (SMN1)**	**ΔCp = Cp(Cy5) - Cp(FAM)**	**Интерпретация**
≥ 10^5 копий/мл	Cp ≤ 25	< 6,0	**Не обнаружена** делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии
≥ 10^5 копий/мл	Cp ≤ 25	От 6,0 до 7,0	Сомнительный результат
≥ 10^5 копий/мл	Cp > 25 или не определяется	≥ 7,0 или не определяется	**Обнаружена** делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии
< 10^5 копий/мл	Не учитывается	Не учитывается	Недостоверный результат

Для амплификатора «CFX96»:

Результат в канале FAM (ALB)	**Результат в канале Cy5 (SMN1)**	**ΔCp = Cp(Cy5) - Cp(FAM)**	**Интерпретация**
≥ 10^5 копий/мл	Cp ≤ 32	< 8,0	**Не обнаружена** делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии
≥ 10^5 копий/мл	Cp ≤ 32	От 8,0 до 9,45	Сомнительный результат
≥ 10^5 копий/мл	Cp > 32 или не определяется	≥ 9,45 или не определяется	**Обнаружена** делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии
< 10^5 копий/мл	Не учитывается	Не учитывается	Недостоверный результат

Внимание! Данный набор реагентов нельзя использовать для постановки диагноза.

При получении положительного результата (наличие патологического состояния, вызванного недостатком лимфопоэза Т- и В- клеток и/или наличие патологического состояния, вызванного делецией в гене SMN1) при анализе СПК, провести повторную процедуру выделения и амплификации из соседнего образца СПК той же ДНК-карты, в случае если при повторном анализе будет получен положительный результат (наличие

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

патологического состояния, вызванного недостатком лимфопоэза Т- и/или В- клеток и/или наличие патологического состояния, вызванного делецией в гене SMN1) дальнейшие действия выполнять на усмотрение лечащего врача, в зависимости от возраста пациента.

14.5 Ограничение теста

Получение значений TREC/KREC, попадающих в промежуточную «группу риска», может наблюдаться у пациентов категории «новорожденные», в т.ч. от матерей, принимавших во время беременности иммуносупрессивные препараты.

На результаты теста может оказать влияние прием препаратов на основе крови (в течение последних трех месяцев), моноклональных антител, иммуносупрессивных препаратов, а также недавно проведенные (за два месяца до анализа) процедуры переливания крови и нарушение технологии изготовления сухих пятен крови.

15 ВНУТРИЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЙ

Для проведения входного контроля качества изделия и периодического внутрилабораторного контроля качества исследований лаборатория может использовать образцы сухих пятен крови от людей, с установленным в анамнезе и подтвержденного другими методами иммунодефицитным состоянием, сопровождающимся снижением количества KREC/TREC и людей с содержанием в крови KREC/TREC в пределах установленных норм, а также от людей с диагнозом СМА и без такового. При выявлении в ходе проведения входного контроля качества изделия и периодического внутрилабораторного контроля качества исследований снижения аналитических характеристик изделия (не подтверждение для внутрилабораторных контрольных образцов ранее установленных характеристик, неадекватная работа калибраторов, положительного контрольного образца) информируют производителя.

16 УТИЛИЗАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

В процессе использования набора реагентов и утилизации наборов реагентов с истекшим сроком годности токсичные отходы не образуются.

Отходы, образующиеся в процессе использования набора реагентов, и наборы реагентов с истекшим сроком годности относить к классу Б.

Обращение (сбор, временное хранение, обеззараживание и/или обезвреживание и транспортирование) отходов, образующихся в процессе использования и утилизации набора реагентов с истекшим сроком годности, проводить согласно СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских

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

поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Для обеззараживания и/или обезвреживания отходов в соответствии с МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» использовать зарегистрированные в РФ дезсредства и оборудование в соответствии с инструкциями по их применению.

Отходы утилизировать через организации, имеющие лицензию на этот вид деятельности.

17 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев.

Срок годности вскрытых компонентов набора реагентов составляет 12 месяцев с даты их изготовления, но не более срока годности, указанного на этикетке каждого компонента. Вскрытые компоненты следует хранить только в течение срока годности набора реагентов.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

«Компоненты для выделения. Упаковка 1» набора реагентов необходимо хранить и транспортировать в оригинальной упаковке в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» раздел XLVIII «Условия транспортирования и хранения иммунобиологических препаратов» при температуре от 2 до 25 °С в течение срока годности. Замораживание не допускается!

«Компоненты для ПЦР-РВ. Упаковка 2» набора реагентов необходимо хранить и транспортировать в оригинальной упаковке в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» раздел XLVIII «Условия транспортирования и хранения иммунобиологических препаратов» при температуре **от минус 24 до минус 16°С** в течение срока годности.

Допускается однократное транспортирование «Компонентов для ПЦР-РВ. Упаковка 2» набора реагентов при температуре от 2 до 8 °С не более 7 суток.

«Расходные материалы. Упаковка 3» набора реагентов необходимо хранить и транспортировать в оригинальной упаковке в соответствии с СанПиН 3.3686-21 при температуре от 10 до 40 °С. Беречь от источников воспламенения. Транспортировать всеми видами крытого транспорта по ГОСТ 15150-69.

Набор реагентов эксплуатировать при следующих условиях:

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

– температура окружающей среды (17 – 27) °С;

– относительная влажность воздуха (не более 70) %;

– атмосферное давление (84,0 – 106,7) кПа / (630 – 800) мм. рт. ст.

18 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых наборов реагентов требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество набора реагентов гарантируются в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки набора реагентов, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил применения, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, обращаться в АО «ГЕНЕРИУМ» 601125, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Заводская, стр. 273, e-mail: QAMD@generium.ru, по тел.: +7 (49243) 72-5-20, +7 (49243) 72-5-14. Рекламации принимаются в письменном виде на бумажном носителе (или в виде скан-копии, направленной на электронную почту организации), заверенном подписью уполномоченного лица и печатью организации.

19 Символы, применяемые для маркировки набора реагентов

Символ	Наименование символа	Символ	Наименование символа
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020			
	Использовать до		Обратитесь к инструкции по применению
	Дата изготовления		Осторожно!
	Код партии		Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
	Не допускать воздействия солнечного света		Содержимого достаточно для 96 и 384 тестов, соответственно
	Запрет на повторное применение		
	Беречь от влаги		Предел температуры

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

Краткая схема анализа набора реагентов «ТК-SMA»

1 ПОДГОТОВКА К ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКЕ ОБРАЗЦОВ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ и СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ

Извлечь из коробки набора реагентов «ПЛ» и инкубировать при комнатной температуре (от 15 до 25 °С) в течение 15 мин., затем аккуратно перемешать содержимое флаконов в течение 20 секунд. При наличии в «ПЛ» кристаллического осадка или хлопьев необходимо инкубировать флакон с «ПЛ» при 65 °С до полного растворения осадка.

2 ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ РУЧНОЙ МЕТОДИКИ

ВНИМАНИЕ! При выделении НК с помощью автоматических станций необходимо следовать алгоритму инструкции, описанному в соответствующих разделах.

3 ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА К ЭТАПУ ВЫДЕЛЕНИЯ НК

3.1 Промаркировать по одной одноразовой пластиковой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого образца цельной крови человека.

3.2 Перемешать образцы цельной крови человека вручную переворачивая пробирку 8-10 раз.

3.3 Перемешать «ПЛ» вручную, вращая флакон между ладонями в течение 20 сек.

ВНИМАНИЕ! При наличии в «ПЛ» кристаллического осадка или хлопьев необходимо инкубировать флакон с «ПЛ» при 65 °С до полного растворения осадка.

3.4 В промаркированные пробирки добавить по 100 мкл «ПЛ».

3.5 Добавить по 100 мкл образцов крови человека в пробирки и перемешать содержимое на вортексе 3 сек.

4 ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ К ЭТАПУ ВЫДЕЛЕНИЯ НК

4.1 Промаркировать по одной одноразовой пластиковой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого образца СПК.

4.2 Из центральной части сухого пятна с образцом крови человека выбить с помощью специального пробойника 1 панч диаметром 6 мм или 3 панча диаметром по 3,2 мм и поместить в промаркированную пробирку. Рекомендуется проводить данную процедуру непосредственно перед выделением НК из СПК.

4.3 В пробирки с выбитыми дисками добавить по 200 мкл «ПЛ».

4.4 Инкубировать пробирки в твердотельном термостате при температуре 75 °С в течение 10 минут. Перемешать содержимое на вортексе 3 сек каждые 5 минут.

ВНИМАНИЕ! Избегать интенсивного перемешивания для предотвращения разрушения бумажной основы диска.

ВНИМАНИЕ! Диск сухого пятна крови должен постоянно находиться в «ПЛ». После инкубации центрифугировать пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 5 сек на максимальном количестве оборотов.

4.5 Отобрать полностью надосадочную жидкость в чистые промаркированные пробирки, не упираясь наконечником в диски и не захватывая бумажную основу.

5 ПОДГОТОВКА К ВЫДЕЛЕНИЮ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

5.1 Перед применением инкубировать при комнатной температуре (от 15 до 25 °С) в течение 15 мин «ЛБ», «РП», «ПР», и «ЭР», затем аккуратно перемешать содержимое флаконов (кроме «ЛБ»). При наличии во флаконах с компонентами кристаллического осадка или хлопьев необходимо прогреть их содержимое при 65 °С до полного растворения осадка.

6 ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ПОДГОТОВЛЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ И ОБРАЗЦОВ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ

6.1 В пробирку с предварительно подготовленным образцом (цельной крови человека (п. 3) или сухим пятном крови человека (п. 4)) внести 250 мкл «ЛБ» перемешать пипетированием, затем 450 мкл «РП», перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 3 сек.

6.2 Инкубировать пробирки в твердотельном термостате при температуре 75 °С в течение 10 минут. Перемешивать содержимое на вортексе 3 сек каждые 3 минуты.

6.3 После инкубации перемешать образцы на вортексе в течение 5 сек и осадить капли на миницентрифуге на максимальном количестве оборотов.

6.4 Поместить пробирки в магнитный штатив, выдержать 1-2 минуты, затем отобрать надосадочную жидкость из пробирок с помощью вакуумного отсасывателя или пипеточного дозатора, не задевая магнитных частиц.

ВНИМАНИЕ! При добавлении раствора, пробирки не вынимать из магнитного штатива! На каждом этапе необходимо убедиться, что магнитные частицы все время остаются смоченными растворами.

НЕ ДОПУСКАТЬ высыхания магнитных частиц!

6.5 Внести по 750 мкл «ПР» в каждую пробирку.

6.6 Закрыть пробирки, перемешать содержимое пробирок переворачиванием магнитного штатива 8-10 раз. НЕ ВЫНИМАТЬ ПРОБИРКИ ИЗ МАГНИТНОГО ШТАТИВА! Отобрать надосадочную жидкость пипеточным дозатором или вакуумным отсасывателем из пробирок и с крышек пробирок, не задевая магнитных частиц, и держа пробирки в магнитном штативе.

6.7 Повторить процедуру отмывки магнитных частиц по пп. 6.5-6.6 еще два раза. Общее количество отмывок – 3.

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

6.8 Открыть пробирки и подсушить осадок магнитных частиц в твердотельном термостате при температуре 75 °С в течение 5 минут.

6.9 Не вынимая пробирки из твердотельного термостата добавить на дно пробирок по 60 мкл «ЭР». Закрыть крышки пробирок.

6.10 Проверить, что «ЭР» полностью покрывает магнитные частицы, иначе аккуратно перемешать в течение 1-3 секунд на вортексе.

6.11 Инкубировать пробирки в твердотельном термостате при температуре 75 °С в течение 10 минут. Перемешивать содержимое на вортексе по 3 сек каждые 3 минуты.

6.12 После инкубации перемешать образцы на вортексе в течение 5 сек и осадить капли на миницентрифуге на максимальном количестве оборотов.

6.13 Образцы выделенных НК готовы для постановки ПЦР анализа.

6.14 Перед внесением в реакционную смесь пробирки с образцами выделенных НК необходимо поставить на магнитный штатив.

7 ПОДГОТОВКА К ПЦР АНАЛИЗУ

7.1 Подготовить амплификатор **заранее** в соответствии с руководством по эксплуатации.

7.2 Разморозить «5×ПЦР-буфер», «ПЦР-смесь», «К1», «К2», «К3», «К4», «ПКО» и «ОКО» при комнатной температуре, перемешать и осадить капли с крышки.

Внимание! «Taq-полимераза» не требует размораживания. Перед применением аккуратно перемешать и осадить капли с крышки пробирки кратким центрифугированием в течение 1-3 секунд. При приготовлении реакционной смеси добавлять «Taq-полимеразу» в последнюю очередь. Перед применением аккуратно перемешать и осадить капли с крышки.

8 ПОДГОТОВКА МИКРОПРОБИРОК/ПЛАНШЕТА

Калибраторы, отрицательный и положительный контроли в одном повторе:	***Калибраторы, отрицательный и положительный контроли в двух повторах:***
Рассчитать количество микропробирок/лунок (N) по формуле: **N= n + 6** где **n** – количество анализируемых образцов, **6** – «К1», «К2», «К3», «К4», «ПКО» и «ОКО»	Рассчитать количество микропробирок/лунок (N) по формуле: **N= n + 12** где **n** – количество анализируемых образцов, **12** – 2х «К1», «К2», «К3», «К4», «ПКО» и «ОКО»

Внимание! Надписи на пробирках следует располагать таким образом, чтобы они не мешали детектированию флуоресцентного сигнала

9 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ

Внимание! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР

9.1 В пробирке объемом 1,5-2 мл смешать реагенты из расчета на необходимое количество N проб:

Название реагента	Объем реагента на одну реакцию	Объем реагента для анализа **N** проб (с учётом 10% запаса объема)
«5×ПЦР-буфер»	5 мкл	5×N×1,1 мкл
«ПЦР-смесь»	9 мкл	9×N×1,1 мкл
«Taq-полимераза»	1 мкл	1×N×1,1 мкл

9.2 Перемешать приготовленную реакционную смесь на вортексе и осадить капли с крышки

10 ВНЕСЕНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ, КАЛИБРАТОРОВ, ОТРИЦАТЕЛЬНОГО, ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЕЙ И АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Калибраторы, отрицательный и положительный контроли в одном повторе:

1) В каждую микропробирку/лунку внести по 15 мкл реакционной смеси

2) Внесение образцов в пробирки/лунки с реакционной смесью необходимо осуществлять в следующей последовательности (для исключения контаминации):

1. 10 мкл «ОКО»
2. по 10 мкл выделенных образцов НК
3. 10 мкл «К4»
4. 10 мкл «К3»
5. 10 мкл «К2»
6. 10 мкл «К1»
7. 10 мкл «ПКО»

Внимание! Перед внесением калибраторов, отрицательного и положительного контрольных образцов, перемешивать содержимое пробирок пипетированием.

3) Планшет заклеить пленкой для ПЦР. Осадить капли со стенок ПЦР-планшета кратким центрифугированием.

Калибраторы, отрицательный и положительный контроли в двух повторах:

1) В каждую микропробирку/лунку внести по 15 мкл реакционной смеси

2) Внесение образцов в пробирки/лунки с реакционной смесью необходимо осуществлять в следующей последовательности (для исключения контаминации):

1. 10 мкл «ОКО»
2. 10 мкл «ОКО»
3. по 10 мкл выделенных образцов НК
4. 10 мкл «К4»
5. 10 мкл «К4»
6. 10 мкл «К3»
7. 10 мкл «К3»
8. 10 мкл «К2»
9. 10 мкл «К2»
10. 10 мкл «К1»
11. 10 мкл «К1»
12. 10 мкл «ПКО»
13. 10 мкл «ПКО»

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

В случае использования микропробирок закрыть крышки. Перед постановкой в амплификатор рекомендуется осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием (1-3 с)

Внимание! Перед внесением калибраторов, отрицательного и положительного контрольных образцов, перемешивать содержимое пробирок пипетированием.

3) Планшет заклеить пленкой для ПЦР. Осадить капли со стенок ПЦР-планшета кратким центрифугированием.

В случае использования микропробирок закрыть крышки. Перед постановкой в амплификатор рекомендуется осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием (1-3 с)

11 ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

11.1 Ввести программу в амплификатор («CFX96», «ДТпрайм»):

Количество циклов	Температура (°С)	Время	Измерение флуоресценции в каналах
1	95	15 мин	-
5	95	10 с	-
	60	30 с	-
	72	15 с	-
40	95	10 с	-
	60	30 с	**FAM**/Green, **R6G**/JOE/HEX/VIC/Yellow **ROX**/Orange и **Cy5**/Red
	72	15 с	-

11.2 Для детекции следует выбирать три канала детекции:

Канал детекции	**FAM**/Green	**R6G**/JOE/HEX/VIC/Yellow	**ROX**/Orange	**Cy5**/Red
Мишень	ALB	KREC	TREC	SMN1

11.3 Запрограммировать положение пробирок с контрольными и анализируемыми образцами согласно рекомендациям к соответствующему амплификатору

11.4 Задать значения концентраций «К1», «К2», «К3», «К4», указанные в приложении к паспорту набора реагентов.

11.5 Поместить пробирки в амплификатор, запустить программу и провести ПЦР-РВ

12 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для **«ОКО»** Ct в каналах **FAM, R6G (HEX), ROX** и **Cy5** должно быть более 39 циклов или не определяться.

Для **«ПКО»** Ct в каналах **FAM, R6G (HEX), ROX и Cy5** должно быть менее 36 циклов.

Для **«К1», «К2», «К3» и «К4»** Ct должны укладываться в диапазон значений, приведенный в приложении к паспорту, эффективность амплификации от 95 до 105%, R2 – не меньше 0,97

Для **анализируемых образцов** концентрация ДНК ALB должна быть более 10^5 копии/мл

Количество копий TREC (KREC) рассчитывается по формуле:

$$\textbf{Кол-во TREC (KREC)} = \frac{\text{кол–во копий } \textbf{TREC (KREC)} \text{ на мл}}{\text{кол–во копий } \textbf{ALB}} * 200\,000 \qquad (1)$$

Референсные значения для разных возрастных групп приведены в приложении к паспорту.

ИДС:

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ ОТСУТСТВУЮТ, ЕСЛИ:

- значение TREC (KREC), рассчитанное по формуле 1, равно или более граничного референсного значения возрастной группы, внутри которой находится пациент, сдавший цельную кровь/сухое пятно крови человека.

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ ПРИСУТСТВУЮТ, ЕСЛИ:

- Ct анализируемого образца не определяется;
- значение TREC (KREC), рассчитанное по формуле 1, менее граничного референсного значения возрастной группы, внутри которой находится пациент, сдавший цельную кровь/сухое пятно крови человека.

ГРУППА РИСКА ПО ВОЗНИКНОВЕНИЮ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ (ДЛЯ КАТЕГОРИИ «НОВОРОЖДЕННЫЕ»), ЕСЛИ:

- значение TREC (KREC), рассчитанное по формуле 1, входит в диапазон граничных референсных значений для категории новорожденных (цельная кровь/СПК человека), требующих наблюдения у врача.

СМА:

- значение Ct в канале Cy5 анализируемого образца НЕ определяется или определяется позже циклов, характерных для конкретной модели амплификаторов.

Для амплификатора «ДТпрайм»:

Результат в канале FAM (ALB)	Результат в канале Cy5 (SMN1)	ΔCp = Cp(Cy5) - Cp(FAM)	Интерпретация
$\geq 10^5$ копий/мл	Cp ≤ 25	< 6,0	**Не обнаружена** делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии
$\geq 10^5$ копий/мл	Cp ≤ 25	От 6,0 до 7,0	Сомнительный результат
$\geq 10^5$ копий/мл	Cp > 25 или не определяется	≥ 7,0 или не определяется	**Обнаружена** делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии
$< 10^5$ копий/мл	Не учитывается	Не учитывается	Недостоверный результат

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

Для амплификатора «CFX96»:

Результат в канале FAM (ALB)	**Результат в канале Cy5 (SMN1)**	**ΔCp = Cp(Cy5) - Cp(FAM)**	**Интерпретация**
≥ 10^5 копий/мл	Cp ≤ 32	< 8,0	**Не обнаружена** делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии
≥ 10^5 копий/мл	Cp ≤ 32	От 8,0 до 9,45	Сомнительный результат
≥ 10^5 копий/мл	Cp > 32 или не определяется	≥ 9,45 или не определяется	**Обнаружена** делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии
< 10^5 копий/мл	Не учитывается	Не учитывается	Недостоверный результат

Внимание! Данный набор реагентов нельзя использовать для постановки диагноза.
При получении положительного результата (наличие патологического состояния, вызванного недостатком лимфопоэза Т- и В- клеток и/или наличие патологического состояния, вызванного делецией в гене SMN1) при анализе СПК, провести повторную процедуру выделения и амплификации из соседнего образца СПК той же ДНК-карты, в случае если при повторном анализе будет получен положительный результат (наличие патологического состояния, вызванного недостатком лимфопоэза Т- и/или В- клеток и/или наличие патологического состояния, вызванного делецией в гене SMN1) дальнейшие действия выполнять на усмотрение лечащего врача, в зависимости от возраста пациента.

Дата создания: 02.02.2024 г.

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

Прошито, пронумеровано и скреплено
печатью 33 (тридцать три) листа/-ов
Генеральный директор ООО «АБВ-ТЕСТ

_____ Шеверда Д.В.



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