ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

Инструкция по применению
НеоСкрин SMA/TREC/KREC

Организация-производитель

СОГЛАСОВАНО
Генеральный директор
ООО «ДНК-Технология ТС»

_____ С.А. Самарин
«12» _____ 2023 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «НПФ ДНК-Технология»

_____ И. Левичев
«12» _____ 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выявления делеции 7 экзона гена SMN1 и оценки содержания эксцизионных колец Т- клеточного рецептора (TREC) и рекомбинационных колец каппа-делеционного элемента (KREC) у новорожденных методом ПЦР в режиме реального времени (НеоСкрин SMA/TREC/KREC)

Варианты исполнения:

Фасовка S, стрипы
Фасовка S, пробирки
Фасовка A

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ ТС»
САМАРИН С.А.
ПОДПИСЬ

2023 г.

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

СМА	- спинальная мышечная атрофия
KREC	- от англ. *kappa-deleting recombination excision circle* – рекомбинационное кольцо каппа-делеционного элемента
MLPA	- от англ. multiplex ligation-dependent probe amplification - метод мультиплексной амплификации лигированных зондов
RCF	- от англ. relative centrifugal force - относительное ускорение центрифуги
SMN1	- от англ. *survival of motor neuron* - «ген выживаемости моторных нейронов 1»
SMN2	- от англ. *survival of motor neuron* - «ген выживаемости моторных нейронов 2»
TREC	- от англ. *T cell receptor (TCR) excision circles* – эксцизионное кольцо Т-клеточного рецептора
ВК	- внутренний контроль
ДИ	- доверительный интервал
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы	- дезоксирибонуклеазы
ИВ	- интерферирующие вещества
К-	- отрицательный контрольный образец
К+№1	- положительный контрольный образец №1
К+№2	- положительный контрольный образец №2
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
ПИД	- первичные иммунодефициты
ПИДС	- первичные иммунодефицитные состояния
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНКазы	- рибонуклеазы
РНС	- расширенный неонатальный скрининг на наличие наследственных и врождённых заболеваний
СПК	- сухое пятно крови
ТКИН	- тяжёлая комбинированная иммунная недостаточность
ЭДТА	- этилендиаминтетраацетат

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

ВВЕДЕНИЕ

Первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС) представляют собой генетически гетерогенную группу врожденных нарушений иммунитета, большинство из которых проявляется в младенчестве и раннем детском возрасте.

Наиболее опасной формой ПИДС является тяжелый комбинированный иммунодефицит (или тяжёлая комбинированная недостаточность клеточного и гуморального звена иммунитета (ТКИН)). ТКИН характеризуется практически полным отсутствием зрелых Т-лимфоцитов при наличии или отсутствии В- и НК-лимфоцитов, приводит к ранним, крайне тяжелым инфекциям вирусно-бактериальной и оппортунистической природы и в отсутствие патогенетической терапии к смерти в первые два года жизни [1].

До недавнего времени было практически невозможно идентифицировать детей с первичными иммунодефицитными состояниями до их манифестации. В течение последнего десятилетия в практику здравоохранения многих стран активно внедряется определение универсальных маркеров Т-клеточных иммунодефицитов – TREC (T-cell receptor excision circle) и В-клеточных иммунодефицитов – KREC (kappa-deleting recombination excision circle) для скрининга врожденных патологий иммунной системы (скрининг на ПИДС (ТКИН)) [2,3]. Исследование TREC и KREC у новорожденных проводится с использованием сухого пятна капиллярной крови карты неонатального скрининга методом ПЦР в реальном времени [2-7].

TREC и KREC представляют собой внехромосомные кольцевые структуры ДНК, образующиеся в процессе перестройки генов, кодирующих Т- (TCR) и В- (BCR) клеточные рецепторы лимфоцитов и служат маркерами популяций наивных Т- и В-клеток [6,7]. Молекулы TREC и KREC стабильны и не реплицируются во время митоза, что позволяет использовать TREC в качестве суррогатного маркера нормальной пролиферации Т-лимфоцитов в тимусе, а KREC – в качестве маркера нормального развития В-клеточного звена иммунной системы.

Вне зависимости от генетического дефекта низкие уровни TREC и KREC в крови новорожденных указывают на Т- и/или В-клеточную лимфопению, что позволяет применять определение уровней TREC и KREC для ранней диагностики иммунодефицитных состояний [1,2,3,5-7].

К настоящему времени доказана эффективность анализа TREC для верификации тяжелого комбинированного иммунодефицита [1,5,6], комбинированных иммунных нарушений без идентифицируемой молекулярной причины [3], синдромальных иммунодефицитных состояний [3]. Установлена эффективность определения KREC для диагностики врожденных агаммаглобулинемий и других В-клеточных расстройств [5,7].

Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q (СМА) – это тяжелое аутосомно-рецессивное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся прогрессирующими

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

симптомами вялого паралича и мышечной атрофии вследствие дегенерации α-мотонейронов передних рогов спинного мозга. Развитие проксимальной спинальной мышечной атрофии 5q обусловлено мутациями в гене SMN1, кодирующем белок выживаемости мотонейронов. Ген SMN1 картирован на хромосоме 5 в локусе 5q12.2-q13.3 и имеет центромерную копию (SMN2). Оба гена состоят из девяти экзонов и различаются пятью нуклеотидами в последовательности ДНК. Вследствие различий в нуклеотидной последовательности основной транскрипт гена SMN2 является функционально неполноценным [8,9].

Потеря экзонов 7 или 7-8 гена SMN1 (по типу истиной делеции или конверсии) в гомозиготном состоянии является наиболее частой причиной СМА 5q [8,9,10].

СМА входит в число частых наследственных заболеваний. Общепопуляционная распространенность проксимальной спинальной мышечной атрофии составляет 1 на 6000 – 10000 новорожденных [9,11].

Для диагностики СМА используется комплекс методов обследования, включающий генеалогический анализ, неврологический осмотр, электронейромиографию. В настоящее время приоритетным диагностическим методом при подозрении на СМА является генетическое тестирование [8,9,11]. Рекомендуется проводить молекулярно-генетическое исследование мутаций в гене SMN1 всем пациентам с подозрением на СМА 5q с целью выявления делеции экзонов 7 или 7-8 и молекулярно-генетического подтверждения диагноза [8]. Диагноз СМА подтверждается при обнаружении делеции 7 экзона или 7-8 экзонов гена SMN1 в гомозиготном состоянии (т. е. в обеих копиях гена) [8].

Генетический скрининг новорожденных на СМА позволяет обнаружить наличие мутации гена SMN1 в первые недели жизни ребенка, до появления первых симптомов, своевременно начать лечение, смягчить течение заболевания, при применении патогенетической терапии избежать инвалидизации пациента.

Список литературы

1. Румянцев А.Г., Масчан А.А., Щербина А.Ю. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению детей с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью. 2015.

2. Blom M., Bredius R. G. M., Weijman G., Dekkers E. H. B. M., Kemper E. A. [et al.]. Introducing Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency (SCID) in the Dutch Neonatal Screening Program. Int. J. Neonatal Screen. 2018;4(4):40.

3. Kwan A., Abraham R. S., Currier R., Brower A., Andruszewski K. [et al.]. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. JAMA.2014;312:729-738.

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

4. Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В., Зимин С.Б., Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Смирнова А.С., Никитина И.А., Корсунский И.А., Филипенко М.Л., Продеус А.П. Разработка набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 467-478.

5. И.А. Корсунский, Д.А. Кудлай, А.П. Продеус, А.Ю. Щербина, А.Г. Румянцев. Неонатальный скрининг на первичные иммунодефицитные состояния и Т-/В-клеточные лимфопении как основа формирования групп риска детей с врожденными патологиями. Педиатрия. 2020; 99 (2): 8-15.

6. van Zelm MC, van der Burg M, Langerak AW, van Dongen JJ. PID comes full circle: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. Front Immunol. 2011 May 4; 2:12.

7. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M [et al.]. Quantification of κ-deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. J. Allergy Clin. Immunol. 2011; 128 (1): 223-225.

8. Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q Клинические рекомендации МЗ РФ. 2020.

9. Забненкова В.В., Дадали Е.Л., Поляков А.В. Проксимальная спинальная мышечная атрофия типов I—IV: особенности молекулярно-генетической диагностики. Нервно-мышечные болезни. 2013; 3:27-31.

10. Диль А.В., Назаров В.Д., Сидоренко Д.В., Лапин С.В., Эмануэль В.Л. Исследование особенностей генетических изменений гена SMN1 при спинальной мышечной атрофии 5q. Нервно-мышечные болезни. 2022; 12 (3): 36-44.

11. Гайдук А.Я., Власов Я.В. Спинальные мышечные атрофии в Самарской области: эпидемиология, классификация, перспективы оказания медицинской помощи. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2019;119(12):88-93.

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

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 **Полное наименование набора реагентов:** Набор реагентов для выявления делеции 7 экзона гена SMN1 и оценки содержания эксцизионных колец Т- клеточного рецептора (TREC) и рекомбинационных колец каппа-делеционного элемента (KREC) у новорожденных методом ПЦР в режиме реального времени (НеоСкрин SMA/TREC/KREC), далее по тексту - набор реагентов.

1.2 **Назначение:** набор реагентов предназначен для выявления гомозиготной делеции 7 экзона гена SMN1 и относительной количественной оценки содержания эксцизионных колец Т-клеточного рецептора (TREC) и рекомбинационных колец каппа-делеционного элемента (KREC) в биологическом материале новорожденных (цельная кровь, сухие пятна крови) в целях проведения скрининга на спинальную мышечную атрофию и первичные иммунодефициты методом ПЦР в режиме реального времени.

1.3 **Функциональное назначение:** скрининг.

1.4 **Показания к проведению анализа:** скрининг новорожденных на проксимальную спинальную мышечную атрофию (СМА) и первичные иммунодефициты (ПИД), ассоциированные с нарушениями Т- и В-клеточного звеньев иммунной системы (формирование групп риска новорождённых). Противопоказаний к применению нет.

1.5 **Популяционные и демографические аспекты:** набор реагентов предназначен для скрининга новорожденных детей, применение не зависит от популяционных аспектов.

1.6 **Область применения:** набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

1.7 **Потенциальные пользователи:** квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

1.8 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF R1-H810-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	50 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец № 1[1]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Положительный контрольный образец № 2[2]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

REF R1-H810-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок	по 20 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	50 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец № 1[1]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Положительный контрольный образец № 2[2]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

[1] - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец № 1» указывается как «К+ №1»
[2] - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец № 2» указывается как «К+ №2»

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

REF R1-H810-MA/9, фасовка А			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации Стрим	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	2 пробирки	по 50 мкл
ПЦР-буфер Стрим-STK	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 1,4 мл
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2 пробирки	по 25 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец № 1[1]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	100 мкл
Положительный контрольный образец № 2[2]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	100 мкл

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

Комплект поставки включает:

- Набор реагентов в одном из вариантов исполнения – 1 шт.;
- Инструкция по применению – 1 экз.;
- Паспорт – 1 экз.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S рассчитан на 96 определений (не более 24 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

Набор реагентов в фасовке А рассчитан на 96 определений (не более 5 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода

Метод: мультиплексная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный анализ (7 экзон гена SMN1), относительный количественный анализ (ДНК TREC, KREC).

Принцип метода основан на амплификации участков ДНК TREC, KREC, 7 экзона гена SMN1 и фрагмента нормировочного гена (эндогенный внутренний контроль (ВК)) с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

[1] - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец № 1» указывается как «К+ №1»
[2] - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец № 2» указывается как «К+ №2»

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

Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина и/или использованием Taq-полимеразы, блокированной антителами. Старт полимеразной цепной реакции происходит только при расплавлении парафина и/или температурной диссоциации комплекса Taq-полимеразы и антител, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

Для амплификации 7 экзона SMN1 применяется зонд-праймер, 3'-конец которого строго соответствует последовательности начального фрагмента 7 экзона гена SMN1, но различается с аналогичным фрагментом гена SMN2.

В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации ДНК TREC, включена флуоресцентная метка Fam.

В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации ДНК KREC включена, флуоресцентная метка Rox.

В состав зонда-праймера, использующегося для амплификации и детекции продукта амплификации целевого фрагмента гена SMN1, включена флуоресцентная метка SIMA (регистрация амплификации выполняется по каналу детекции Hex).

В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации фрагмента гена эндогенного внутреннего контроля (ВК), включена флуоресцентная метка Cy5.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок и биоматериала, необходимого для проведения исследования, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

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

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5
TREC	SMN1 (7 экзон SMN1)	KREC	ВК*

* - ВК – эндогенный внутренний контроль, представляет собой однокопийный геномный локус, служит для оценки геном-эквивалентов ядросодержащих клеток (лейкоцитов) крови и контроля качества препарата ДНК.

Содержание TREC и KREC в неизвестном образце оценивается по формулам:

1. Содержание ***TREC*** **(копий на 10^5лейкоцитов)** $= 10^{((Cp\,BK - Cp\,TREC)/3{,}4)} \times 200000$ (1)

где Ср ВК – значение индикаторного цикла (Ср) ВК;

где Ср TREC – значение индикаторного цикла (Ср) TREC.

Если значение Ср TREC для образца не указано, содержание TREC составляет 0 копий на 10^5 лейкоцитов.

2. Содержание ***KREC*** **(копий на 10^5лейкоцитов)** $= 10^{((Cp\,BK - Cp\,KREC)/3{,}4)} \times 200000$ (2)

где Ср ВК – значение индикаторного цикла (Ср) ВК;

где Ср KREC – значение индикаторного цикла (Ср) KREC.

Если значение Ср KREC для образца не указано, содержание KREC составляет 0 копий на 10^5 лейкоцитов.

Анализ делеции 7 экзона SMN1 основан на оценке разницы индикаторного цикла (Δ Ср) между значениями Ср SMN1 (канал детекции Hex) и Ср ВК (канал детекции Cy5) (**Δ Ср = Ср (Hex) – Ср (Cy5)**).

Ограничение метода:

Для корректной оценки содержания эксцизионных колец TREC и KREC и генотипирования по 7 экзону гена SMN1 количество геномной ДНК на амплификационную пробирку должно составлять не менее 1,0 нг геномной ДНК (допустимое значение Ср по каналу детекции Cy5 (ВК) ≤ 31).

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификация ДНК с одновременной детекцией результатов с использованием набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC.

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

Реагенты для выделения ДНК не включены в состав набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC в вариантах исполнения: фасовка S, пробирки и фасовка S, стрипы, фасовка А.

Рекомендованными (валидированными) к совместному использованию с набором реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC в вариантах исполнения: фасовка S, пробирки и фасовка S, стрипы являются наборы реагентов:

- Набор реагентов для выделения ДНК человека из сухих пятен крови (ПРОБА-ЦИТО СП), ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2021/14367;

- Набор реагентов для выделения ДНК ПРОБА-МЧ МАКС, ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2021/14391;

- Набор реагентов для выделения ДНК человека из сухих пятен крови (ПРОБА-МЧ-СП DWP), ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2023/19623.

Рекомендованными (валидированными) к совместному использованию с набором реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC в вариант исполнения фасовка А являются наборы реагентов:

- Набор реагентов для выделения ДНК человека из сухих пятен крови (ПРОБА-МЧ-СП DWP), ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2023/19623.

2.4 Время проведения анализа (с учетом пробоподготовки): от 2,5 часов (в зависимости от количества образцов и используемого набора реагентов для выделения ДНК).

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

3 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

3.1 Специфичность анализа

В образцах биологического материла, содержащих ДНК TREC, KREC, 7 экзона гена SMN1, гена ВК, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по заявленным каналам детекции.

В образцах биологического материала человека, не содержащего ДНК TREC, KREC, 7 экзона гена SMN1, при проведении амплификации экспоненциальный рост флуоресценции по заявленным каналам детекции отсутствует или ниже фонового значения; возможна регистрация экспоненциального роста уровня флуоресценции по каналу детекции Hex в случае гомозиготной делеции 7 экзона гена SMN1 при условии разницы между значениями Cp по каналу детекции Hex и Cp по каналу детекции Cy5 (Δ Cp) ≥ 8.

В ходе НИОКР была проведена проверка специфичности набора реагентов биоинформатическими методами. Показано отсутствие перекрестных неспецифических реакций для каждой из систем олигонуклеотидов (TREC, KREC, SMN1, ВК), входящих в состав набора реагентов.

Аналитическая специфичность набора регентов подтверждена с использованием генно-инженерных конструкций (рекомбинантных плазмид) соответствующих последовательностям ДНК выявляемых показателей (TREC, KREC, SMN1, ВК).

Специфичность детекции ДНК TREC, KREC в присутствии геномной (хромосомной) ДНК подтверждена при тестировании препаратов ДНК клеточной линии Hela, для которой не характерна перестройка генов Т- и В-клеточных рецептов и наличие кольцевых молекул TREC и KREC.

Специфичность выявления делеции 7 экзона SMN1 в гомозиготном состоянии установлена с применением двух вариантов генно-инженерных конструкций, соответствующих 7 экзону SMN1 и SMN2 генов, а также подтверждена на клиническом материале.

Набор реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC позволяет выявлять потери 7 экзона гена SMN1 по типу истинных делецией (делеции 7 экзона и 7-8 экзонов) или генной конверсии c.850C>T (конверсия SMN1 в SMN2) в гомозиготном состоянии(см. 3.6.2.).

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

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных и недостоверных результатов. Признаками ингибирования ПЦР являются отсутствие кривой накопления внутреннего контроля, искажение ее формы (кривая накопления не имеет типичной s-образной формы, не достигает плато, имеет пологий характер) либо резкий сдвиг по шкале Ср вправо.

К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец биологического материала, отнесены антикоагулянты, применяемые при взятии крови, а также интерферирующие вещества эндогенной природы – гемоглобин, билирубин, холестерин и триглицериды. Предельные допустимые концентрации потенциальных интерферирующих веществ в образце исходного биоматериала приведены в таблице 2.

К потенциальным ингибиторам в препаратах ДНК отнесены: промывочный раствор №2 набора реагентов «ПРОБА-МЧ МАКС», промывочный раствор №2 набора реагентов «ПРОБА-МЧ-СП DWP», крезоловый красный в составе элюирующего раствора набора реагентов «ПРОБА-МЧ-СП DWP», остаточный гемоглобин (для препаратов ДНК, полученных с применением набора реагентов «ПРОБА-ЦИТО СП»).

Примечание – Максимальное количество промывочного раствора №2 набора реагентов «ПРОБА-МЧ МАКС», при котором не наблюдалось ингибирование ПЦР, составляет не более 25% от объёма препарата ДНК. Максимальное количество промывочного раствора №2 набора реагентов «ПРОБА-МЧ-СП DWP», при котором не наблюдалось ингибирование ПЦР, составляет не более 12,5% от объёма препарата ДНК. Максимальное количество крезолового красного, входящего в состав набора реагентов «ПРОБА-МЧ-СП DWP», при котором не наблюдалось ингибирование ПЦР, составляет не более 0,0125 нг/мл. Максимальная концентрация гемоглобина, при которой не наблюдалось ингибирования ПЦР, составляет не более 0,5 мг/мл в препарате ДНК (для препаратов ДНК, полученных с применением набора реагентов «ПРОБА-ЦИТО СП».

При строгом соблюдении инструкций по применению рекомендованных наборов реагентов для выделения ДНК эффекта ингибирования ПЦР промывочными растворами, крезоловым красным и гемоглобином не наблюдается.

Целлюлозное волокно и остаточные количества химических компонентов пропитки и разметки фильтровальной бумаги в образцах сухих пятен крови не оказывают ингибирующего влияния.

Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия биологического материала (см. 6.2).

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

Таблица 2 – Предельные допустимые концентрации потенциальных интерферирующих веществ в образце исходного биоматериала.

Вид биоматериала	Интерферирующее вещество	Исследованная концентрация в образце
Экзогенные		
Цельная кровь	К2, К3 ЭДТА	3,60 мг/мл
	Цитрат натрия	0,26 моль/л
Эндогенные		
Цельная кровь, сухие пятна крови	Гемоглобин	250 г/л
	Билирубин	500 мкмоль/л
	Холестерин	12 ммоль/л
Сухие пятна крови	Триглицериды	500 мг/л

В случае наличия в образце ПЦР-ингибирующих примесей рекомендуется либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

3.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения TREC и KREC

- 5 копий на 10^5 лейкоцитов (при Ср Cy5 <28)
- 10^3 копий на 10^5 лейкоцитов (при Ср Cy5 $28 \leq Ср \leq 31$)

Аналитический предел обнаружения (амплификатор регистрирует положительный результат) составляет 5 копий на амплификационную пробирку для каждого аналита (TREC, KREC, SMN1 и ВК).

3.4 Диапазон измерения TREC и KREC

- $15 – 10^5$ копий на 10^5 лейкоцитов (при Ср Cy5 < 28)
- $10^3 – 10^5$ копий на 10^5 лейкоцитов (при Ср Cy5 $28 \leq Ср \leq 31$)

3.5 Характеристики точности:

3.5.1 Повторяемость и воспроизводимость определения содержания TREC и KREC (Lg копий/10^5 лейкоцитов): коэффициент вариации (%CV) составляет ≤10.

3.5.2 Правильность определения содержания TREC и KREC (Lg копий/10^5 лейкоцитов): относительная погрешность (δx) составляет ≤5%.

3.5.3 Предельная ошибка (аналитическая) определения содержания TREC и KREC составляет ±0,1 Lg копий/10^5 лейкоцитов.

3.5.4 Предел точности определения содержания TREC и KREC составляет ±0,3 Lg копий/10^5 лейкоцитов.

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

3.6 Диагностические характеристики

3.6.1 Диагностические характеристики определения показателей TREC и KREC

	TREC	KREC
Количество образцов	61	61
Диагностическая чувствительность (ДИ95%)	100.00% (88.78%-100.00%)	93.33% (68.05%-99.83%)
Диагностическая специфичность (ДИ95%)	100.00% (88.43%-100.00%)	97,83% (88.47%-99.95%)

Примечание – При использовании набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC:

- при оценке содержания эксцизионных колец Т-клеточного рецептора (TREC) положительным результатом считали **отсутствие или значение менее нижнего предела референтного интервала** эксцизионных колец Т-клеточного рецептора (TREC);
- при оценке содержания рекомбинационных колец каппа-делеционного элемента (KREC) положительным результатом считали **отсутствие или значение менее нижнего предела референтного интервала** рекомбинационных колец каппа-делеционного элемента (KREC).

3.6.2 Диагностические характеристики по показателю делеция 7 экзона SMN1 в гомозиготном состоянии

Результаты определения делеции 7 экзона SMN1 набором реагентов:

Характеристика группы на основе данных MLPA по числу копий экзонов 7 и 8 генов SMN1 и SMN2 и варианта изменений гена SMN1	**Число образцов**	**Результат НеоСкрин SMA/TREC/KREC экзон 7 гена SMN1**	
		≥ 1 копии (N)	**0 копий (del)**
Условная норма: количество SMN1 – 2 копии, количество SMN2 – 2 копии.	54	54	0
Дупликация гена (SMN1): количество SMN1 – 3 копии, количество SMN2 – 0-3 копии	23	23	0
Носительство делеции гена (SMN1): количество SMN1 – 1 копия, количество SMN2 – 0-4 копии	51	51	0
Истинная гомозиготная делеция гена (SMN1)[1]: количество SMN1 – 0 копий, количество SMN2 – 2 копии.	9	0	9
Конверсия гена (SMN1)[1]: количество SMN1 – 0 копии, количество SMN2 – 3 - 4 копии	47	0	47
Гибридные гены SMN1/SMN2 с частичной делецией гена SMN1[1]: количество экзона 7 SMN1 - 0 копий.	9	0	9
Носительство делеции 7 экзона гена SMN1 и гетерозиготная точечная мутация гена SMN1 (c.815A> G, rs104893922)[2]	1	1	0
Прочие варианты[1] сочетания копий генов \ копий экзона 7 и 8 SMN1 и SMN2	13	11	2
Всего	**207**	**140**	**67**

[1] - группы, включающие образцы с патогенным вариантом изменениями гена SMN1 (делеции и\или конверсии экзона 7 гена SMN1) в гомозиготном состоянии (генетический диагноз СМА 5q);

[2] – точечная патогенная мутация установлена методами секвенирования гена SMN1 (сочетание носительства делеции и патогенной мутации во второй копии гена SMN1 - генетический диагноз СМА 5q);

N – Не обнаружена делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (определено наличие 1 или более копий экзона 7 гена SMN1);

del – Обнаружена делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (определено 0 копий экзона 7 гена SMN1).

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

	Делеция 7 экзона SMN1 в гомозиготном состоянии
Количество образцов	207
Диагностическая чувствительность (ДИ95%)	100.00% (94.64%- 100.00%)
Диагностическая специфичность (ДИ95%)	100.00% (97.40%-100.00%)

Примечание – Для набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC при оценке 7 экзона гена SMN1 положительным результатом считали **обнаружение** делеции 7 экзона гена SMN1 **в гомозиготном состоянии.**

3.7 Воспроизводимость результатов

Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость результатов подтверждена при проведении клинико-лабораторных испытаний при исследовании 20 образцов с использованием двух наборов реагентов одной серии и одного набора реагентов второй серии, и разных детектирующих амплификаторов. Для всех образцов получено 100% совпадение результатов (ДИ95% составляет 97,84–100% по каждому показателю).

Критерии совпадения результатов:

7 экзон SMN1: совпадение результата определения делеции 7 экзона гена SMN1; TREC: абсолютное значение отклонения показателя TREC не более 0,3 десятичного логарифма; KREC: абсолютное значение отклонения KREC не более 0,3 десятичного логарифма.

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

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, 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», с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Неизвестные образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька.

При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

К работе с набором реагентов допускается персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

Подготовку биологического материала и выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводятся выделение ДНК и постановка ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР (МУ 1.3.2569-09).

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

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

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских 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».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасного компонента	Указание на риски
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	IGEPAL CA-630	H302, H315, H319, H412
Смесь для амплификации Стрим	Азид натрия менее 0,1%	Является безопасным для конечного пользователя
ПЦР-буфер	IGEPAL CA-630	H302, H315, H319, H412
ПЦР-буфер Стрим-STK	IGEPAL CA-630	H302, H315, H319, H412
Полимераза Техно Taq MAX	Нет опасных веществ	-
Минеральное масло	Нет опасных веществ	-
Положительный контрольный образец № 1	Азид натрия менее 0,1%	Является безопасным для конечного пользователя
Положительный контрольный образец № 2	Азид натрия менее 0,1%	Является безопасным для конечного пользователя
Расшифровка обозначений: H302 – Вредно при проглатывании; H315 – Вызывает раздражение кожи; H319 – Вызывает раздражение глаз; H412 – Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.		

При работе с набором реагентов следует использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, не глотать. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;
- по истечению срока годности набора реагентов.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

Оборудование и расходные материалы	Фасовка S, стрипы	Фасовка S, пробирки	Фасовка A
ПЦР-бокс	да	да	да[1]
Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм *M*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229	да	да	да
Амплификатор детектирующий «ДТлайт» (модификация «ДТпрайм *S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228	да	да	да[2]
микроцентрифуга-вортекс	да	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет	да[3]
холодильник с морозильной камерой	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл	нет	да	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет	да[3]
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	да	да[1]
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 2,0 мл юбочных	нет	нет	да[1]
дозаторы механические или электронные переменного объёма, позволяющие отбирать объём жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл	да	да	да[1]
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да[1]
штатив для дозаторов	да	да	да[1]
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл; 2,0 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	да	да[1]
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да	да
Устройство дозирующее ДТстрим в варианте исполнения *M4, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982	нет	нет	да[4]
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	нет	нет	да[4]
устройство для запечатывания планшетов ДТпак (ООО «НПО ДНК-Технология»)	нет	нет	да[5]
центрифуга с RCF(g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов	нет	нет	да[5]
полимерная термопленка для запечатывания микропланшетов 96 лунок	нет	нет	да[5]
микропланшет 96 лунок[6] или пробирки стрипованные объёмом 0,2 мл и крышки к пробиркам стрипованным, свободные от РНКаз и ДНКаз	нет	нет	да
набор реагентов для выделения ДНК из биологического материала[7]: - Набор реагентов для выделения ДНК человека из сухих пятен крови (ПРОБА-ЦИТО СП), ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2021/14367; - Набор реагентов для выделения ДНК ПРОБА-МЧ МАКС, ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2021/14391; - Набор реагентов для выделения ДНК человека из сухих пятен крови (ПРОБА-МЧ-СП DWP), ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2023/19623.			

[1] - только для ручного дозирования
[2] - только для ручного дозирования с использованием стрипов
[3] - при использовании стрипов
[4] - только для автоматизированного дозирования
[5] - при использовании микропланшетов
[6] - не используется для детектирующего амплификатора «ДТлайт»
[7] - возможность использования набора реагентов для выделения ДНК определяется видом биологического материала

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

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют сухие пятна крови или образцы цельной периферической крови.

Ограничение метода - внутривенные инъекции гепарина, инфузии препаратов для парентерального питания менее чем за 6 часов до исследования.

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 и СанПиН 3.3686-21.

6.2 Взятие материала на исследование

ВНИМАНИЕ! Перед выделением ДНК может потребоваться предварительная подготовка образцов биологического материала (см. 6.4).

6.2.1 Сухие пятна крови

Взятие крови новорожденных для получения сухого пятна крови осуществляют в соответствии с рекомендациями по забору крови при проведении массового обследования новорожденных детей на наследственные заболевания и инструкциями производителей к бумажным фильтровальным тест-бланкам[1], зарегистрированным в установленном порядке.

На бумажный носитель (тест-бланк) наносится кровь в количестве, достаточном для получения пятна диаметром не менее 1,0 см, при этом кровь должна пропитать бумагу насквозь. После нанесения образца тест-бланк высушивается в горизонтальном положении на чистой обезжиренной поверхности в течение не менее 2 часов без применения дополнительной тепловой обработки.

ВНИМАНИЕ! Не допускается прямое попадание солнечных лучей (ультрафиолета), тепловое воздействие и попадание влаги на образцы СПК во время высушивания и хранения!

6.2.2 Цельная периферическая кровь

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объёмом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2-3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

---

[1] - в ходе клинических испытаний производителем были валидированы следующие бумажные фильтровальные тест-бланки: Карта для забора и транспортировки биологического материала по ТУ 9398-001-63802255-2016, ООО «Гринвэн», Россия (РУ № РЗН 2017/6431).

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

6.3 Транспортирование и хранение образцов биологического материала

6.3.1 Сухие пятна крови

Для предотвращения загрязнения и перекрёстной контаминации тест-бланки с пятнами крови после просушивания индивидуально упаковываются.

Транспортировка и хранение образцов сухих пятен крови на тест-бланках проводится в соответствии с инструкциями производителей.

6.3.2 Цельная периферическая кровь

Допускается транспортирование и хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение 6 месяцев.

6.4 Подготовка сухих пятен крови для выделения ДНК

ВНИМАНИЕ! Для выделения ДНК требуется три диска образца сухой крови диаметром 3,0–3,2 мм.

Выбивание дисков из образцов СПК выполняется с использованием ручного или автоматического перфоратора в пробирки 1,5 мл (для набора реагентов «ПРОБА-ЦИТО СП») или глубоколуночный планшет (для набора реагентов «ПРОБА-МЧ-СП DWP»).

Выбитые диски должны быть полностью пропитаны кровью. Рекомендуется выбивать диски из центральной области пятна, не захватывая область ограничивающей краски.

При использовании ручного перфоратора для снижения риска кросс-контаминации проб перед выбиванием дисков из каждого нового образца СПК рекомендуется делать 2–3 высечки на чистом участке фильтровальной бумаги.

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

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Для выделения ДНК из образцов сухих пятен и цельной крови используют наборы реагентов для выделения ДНК, зарегистрированные в РФ в установленном порядке (см. таблицу 3).

Таблица 3 – Наборы реагентов для выделения ДНК, валидированные для совместного использования с набором реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC.

Набор реагентов, РУ	**Биоматериал**	Совместимая фасовка набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC
Набор реагентов для выделения ДНК человека из сухих пятен крови (ПРОБА-МЧ-СП DWP), ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2023/19623	Сухие пятна крови	Фасовка S, Фасовка A
Набор реагентов для выделения ДНК человека из сухих пятен крови (ПРОБА-ЦИТО СП), ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2021/14367	Сухие пятна крови	Фасовка S
Набор реагентов для выделения ДНК ПРОБА-МЧ МАКС по ТУ 21.20.23-106-46482062-2019, ООО «ДНК- Технология ТС», РУ № РЗН 2021/14391	Цельная периферическая кровь	Фасовка S

ВНИМАНИЕ!

1. Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. Для этого рекомендуется использовать отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора реагентов для выделения ДНК в объёме, указанном в инструкции по применению соответствующего набора реагентов.
2. При использовании наборов выделения ДНК невалидированных для совместного использования с набором реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC производитель не гарантирует корректную интерпретацию результатов исследования.

7.1.1 Цельная периферическая кровь

Выделение ДНК из цельной крови выполняется с использованием набора реагентов ПРОБА-МЧ МАКС в соответствии с инструкцией по применению. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать отрицательный контрольный образец из набора реагентов ПРОБА-МЧ МАКС.

ВНИМАНИЕ! Элюцию ДНК следует проводить в 100 мкл буфера для растворения.

Полученный препарат ДНК можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более

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

семи суток или при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

Примечание – Если предполагается хранить препарат ДНК более семи суток, необходимо перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

7.1.2 Сухие пятна крови

Выделение ДНК из сухих пятен крови выполняется с использованием наборов реагентов ПРОБА-ЦИТО СП или ПРОБА-МЧ-СП DWP в соответствии с инструкциями по применению.

Полученный препарат ДНК можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более семи суток или при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
2. При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы», следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.2.1 Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого неизвестного образца, отрицательного контрольного образца (К–), положительного контрольного образца № 1 (К+№1) и положительного контрольного образца № 2 (К+№2).

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 24 постановки при условии вариабельного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 2 положительных контрольных образцов в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 5 пробирок для неизвестных образцов; одну пробирку для отрицательного контрольного образца «К–» и две пробирки для положительных контрольных образцов «К+№1», «К+№2». Общее количество пробирок – 8.

7.2.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq МАХ следует доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.3 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq МАХ. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

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

- 10×(N+1) мкл ПЦР–буфера,
- 0,5×(N+1) мкл полимеразы ТехноТаq MAX,

где N — количество промаркированных пробирок с учётом «К-», «К+№1» и «К+№2».

Пример:

Необходимо проанализировать 5 неизвестных образцов, «К-», «К+№1» и «К+№2». Промаркированных пробирок – 8.

Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX для 9 (8+1) пробирок, т.е. 90 мкл ПЦР-буфера + 4,5 мкл полимеразы ТехноТаq MAX.

7.2.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.2.5 Добавьте во все промаркированные пробирки (включая «К-», «К+№1» и «К+№2»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX.

ВНИМАНИЕ! Не допускается хранение стрипов со смесью для амплификации после добавления в них смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX, после дозирования необходимо сразу выполнить 7.2.6- 7.2.12.

7.2.6 Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте пробирки/стрипы.

7.2.7 Встряхните пробирки с положительными контрольными образцами «К+№1», «К+№2» на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Если препараты ДНК хранились от минус 18 °С до минус 22 °С, то их следует разморозить при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) или при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается только однократное размораживание препарата ДНК.
2. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-СП DWP следует центрифугировать глубоколуночный планшет с препаратами ДНК при RCF(g) 150 в течение 30 с, снять защитную плёнку и перемешать их пипетированием 3-5 раз.
3. При использовании для выделения ДНК наборов реагентов ПРОБА-ЦИТО СП следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом «К-» на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.
4. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ МАКС необходимо

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

центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом «К-» на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с, затем поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом «К-» на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

5. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Закрывайте пробирки/стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.8 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К-», «К+№1» и «К+№2» ДНК не вносится.

7.2.9 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

7.2.10 Внесите в пробирки, промаркированные «К+№1», «К+№2», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл соответствующего положительного контрольного образца.

7.2.11 Центрифугируйте пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.2.12 Установите все пробирки/стрипы в блок детектирующего амплификатора.

7.2.13 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест[1]. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в Приложении Б.

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А, с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующего амплификатора ДТпрайм)

[1] - тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов.

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

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
2. Фасовка А с использованием дозирующего устройства ДТстрим предназначена для одновременной постановки 96 образцов, включая контрольные образцы.

7.3.1 Промаркируйте 12 стрипов\ 96 стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл или микропланшет 96 лунок для неизвестных образцов, отрицательного контрольного образца «К-» и положительных контрольных образцов «К+№1», «К+№2».

7.3.2 Тщательно перемешайте содержимое пробирок со смесью для амплификации Стрим, ПЦР-буфером Стрим-STK и положительными контрольными образцами «К+№1», «К+№2» на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.3.3 Центрифугируйте пробирки с минеральным маслом и полимеразой ТехноТаq MAX на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq MAX необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.4 Установите пробирки со смесью для амплификации Стрим, ПЦР-буфером Стрим-STK, минеральным маслом, полимеразой ТехноТаq MAX и положительными контрольными образцами «К+№1», «К+№2» на рабочий стол ДТстрим, снимите крышки пробирок.

ВНИМАНИЕ! Сохраняйте крышки пробирок от реагентов и положительных контрольных образцов до окончания дозирования. Перед утилизацией необходимо закрыть пробирки крышками.

7.3.5 Установите планшет с образцами ДНК, штативы с наконечниками, а также стрипы или микропланшет 96 лунок на рабочий стол ДТстрим, проведите дозирование компонентов согласно сценарию для набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC в варианте исполнения фасовка А.

7.3.6 В случае использования микропланшетов 96 лунок:

7.3.6.1 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет 96 лунок в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак.

7.3.6.2 Проведите запечатывание микропланшета 96 лунок полимерной термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.3.6.3 Центрифугируйте микропланшет 96 лунок при RCF(g) 100 в течение 30 с.

7.3.7 В случае использования стрипов:

7.3.7.1 Плотно закройте стрипы.

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

7.3.7.2 Центрифугируйте все стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

7.3.8 Установите стрипы или микропланшет 96 лунок в блок детектирующего амплификатора.

7.3.9 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест[1]. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в Приложении Б.

7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А, ручное дозирование

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.4.1 Промаркируйте необходимое количество одноразовых стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл или микропланшет 96 лунок для неизвестных образцов, отрицательного контрольного образца (К–) и положительных контрольных образцов «К+№1», «К+№2».

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 5 постановок при условии вариабельного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 2 положительных контрольных образцов в каждой постановке.

Пример: Необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 5 пробирок для неизвестных образцов; одну пробирку для отрицательного контрольного образца «К–» и две пробирки для положительных контрольных образцов «К+№1», «К+№2». Общее количество пробирок/лунок микропланшета– 8.

7.4.2 Тщательно перемешайте содержимое пробирок со смесью для амплификации Стрим, ПЦР-буфером Стрим-STK и положительным контрольным образцом №1 и положительным контрольным образцом №2 на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.4.3 Центрифугируйте пробирки с минеральным маслом и полимеразой ТехноТаq MAX на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq MAX необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.4.4 Приготовьте смесь ПЦР-буфера Стрим-STK с полимеразой ТехноТаq MAX и смесью для амплификации Стрим. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

[1] - тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов.

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

- 1,0×(N+1) мкл смеси для амплификации Стрим;
- 29×(N+1) мкл ПЦР–буфера Стрим-STK,
- 0,5×(N+1) мкл полимеразы ТехноТаq MAX,

где N — количество промаркированных пробирок/количество необходимых лунок микропланшета с учётом «К-», «К+№1» и «К+№2».

Пример:

Необходимо проанализировать 5 неизвестных образцов, «К-», «К+№1» и «К+№2». Промаркированных пробирок – 8. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера Стрим-STK с полимеразой ТехноТаq MAX и смесью для амплификации Стрим для 9 (8+1) пробирок/лунок микропланшета, т.е. 9,0 мкл смеси для амплификации Стрим, 261 мкл ПЦР-буфера Стрим-STK + 4,5 мкл полимеразы ТехноТаq MAX.

7.4.5 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера Стрим-STK с полимеразой ТехноТаq MAX и смесью для амплификации Стрим на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера Стрим-STK с полимеразой ТехноТаq MAX и смесью для амплификации Стрим необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.4.6 Внесите во все промаркированные пробирки/лунки микропланшета (включая «К-», «К+№1» и «К+№2») по 30 мкл смеси ПЦР-буфера Стрим-STK с полимеразой ТехноТаq MAX и смесью для амплификации Стрим.

ВНИМАНИЕ! Не допускается хранение смеси ПЦР-буфера Стрим-STK с полимеразой ТехноТаq MAX и смеси для амплификации Стрим в стрипованных пробирках/ микропланшете, после дозирования смеси необходимо сразу выполнить пункты 7.4.7 – 7.4.15.

7.4.7 Добавьте в пробирки/лунки со смесью по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте стрипы.

7.4.8 Центрифугируйте глубоколуночный планшет с препаратами ДНК при RCF(g) 150 в течение 30 с, снимите защитную плёнку и перемешайте их пипетированием 3-5 раз.

ВНИМАНИЕ!

Для предотвращения контаминации следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Закрывайте стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.4.9 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки/лунки микропланшета по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки/лунки, промаркированные «К-», «К+№1» и «К+№2», ДНК не вносится.

7.4.10 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К-» 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

7.4.11 Внесите в пробирки/лунки, промаркированные «К+№1», «К+№2», по 5,0 мкл

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

соответствующего положительного контрольного образца.

7.4.12 В случае использования микропланшетов 96 лунок:

7.4.12.1 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет 96 лунок в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак.

7.4.12.2 Проведите запечатывание микропланшета 96 лунок полимерной термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.4.12.3 Центрифугируйте микропланшет 96 лунок при RCF(g) 100 в течение 30 с.

7.4.13 В случае использования стрипов:

7.4.13.1 Плотно закройте стрипы.

7.4.13.2 Центрифугируйте все стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

7.4.14 Установите стрипы или микропланшет 96 лунок в блок детектирующего амплификатора.

7.4.15 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест[1]. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в Приложении Б.

[1] - тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов.

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

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится детектирующим амплификатором автоматически во время амплификации.

Детекция результатов осуществляется детектирующим амплификатором автоматически. Оформление протокола и анализ результатов проводятся в соответствии с инструкцией к прибору.

9 УЧЁТ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Учет результатов реакции осуществляется с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 Интерпретация результатов для каждого образца проводится с учётом значений Ср ДНК-мишеней TREC, SMN1 и KREC (каналы детекции Fam/Hex/Rox) и эндогенного внутреннего контроля (ВК) (канал детекции Cy5).

9.3 Критерии валидности положительного контрольного образца № 1:

Ср TREC (**Fam**)	Ср SMN1 (**Hex**)	Ср KREC (**Rox**)	Ср ВК (**Cy5**)
Указан	Указан	Указан	Указан
$\Delta Cp = \lvert Cp\ Fam - Cp\ Cy5 \rvert \leq 1$	-	$\Delta Cp = \lvert Cp\ Rox - Cp\ Cy5 \rvert \leq 1$	-

9.4 Критерий валидности положительного контрольного образца № 2:

Ср TREC (**Fam**)	Ср SMN1 (**Hex**)	Ср KREC (**Rox**)	Ср ВК (**Cy5**)
Не указан или ≥ 39	Не указан или ≥ 35	Не указан или ≥ 39	Указан

9.5 Критерий валидности отрицательного контрольного образца:

Ср TREC (**Fam**)	Ср SMN1 (**Hex**)	Ср KREC (**Rox**)	Ср ВК (**Cy5**)
Не указан или ≥ 39	Не указан или ≥ 38	Не указан или ≥ 39	Не указан или ≥ 37

ВНИМАНИЕ! При невыполнении любого из указанных условий валидности (см. 9.3 - 9.5) амплификации положительных контрольных образцов результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка ПЦР всей партии образцов.

9.6 Регистрация значения Ср по любому из каналов детекции для отрицательного контрольного образца может быть следствием контаминации (кросс-контаминации образцов при выполнении пробоподготовки, контаминации ПЦР-бокса образцами геномной ДНК и положительными контрольными образцами, а также контаминации лаборатории продуктами амплификации).

При регистрации значения Ср для отрицательного контрольного образца за пределами допустимых значений Ср (см. 9.5), а также регистрации Ср по каналу детекции

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

Fam/Rox <39 для положительного контрольного образца №2 рекомендуется проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации. Результаты постановочной серии рекомендуется считать недостоверными, после устранения контаминации требуется повторное проведение исследования, начиная с этапа пробоподготовки биоматериала.

9.7 Для образцов, прошедших ПЦР со значением Ср ВК (канал детекции Cy5) ≤ 31, результат определяется как достоверный.

Содержание TREC и KREC оценивается по формулам 1 и 2 соответственно (см. 2.3), интерпретация выполняется в соответствии с таблицей 4 с учетом нижней границы биологического референтного интервала\ порогового значения нормы скрининга новорожденных для TREC и KREC (Приложение А).

Интерпретация результатов исследования на наличие гомозиготной делеции 7 экзона SMN1 выполняется в соответствии с таблицей 5.

9.8 В образцах со значением Ср ВК (канал детекции Cy5)> 31 результат определяется как недостоверный результат (нд). Недостоверный или сомнительный результат может быть обусловлен недостаточным количеством или качеством исходного биологического материала, нарушением протокола пробоподготовки или вызван присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола ПЦР-анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

ВНИМАНИЕ!

1. Результат интерпретации результатов исследования может быть сомнительным в случаях:

- переливания крови, проведения терапии, оказывающей влияние на лейкопоэз новорожденного (например, введение лекарственных ингибиторов лейкопоэза);
- приема препаратов или проведения иных видов терапии во время беременности, оказывающих влияние на формирование иммунной системы плода.

2. Результаты исследования могут быть интерпретированы только в комплексе с результатами других лабораторных и инструментальных исследований, клинической картиной, а также гестационным возрастом новорожденного.

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

Таблица 4 – Интерпретация результатов определения TREC и KREC

Значение показателя	TREC	KREC
В пределах биологического референтного интервала\выше порогового значения границы нормы (Приложение А)	Условная норма	Условная норма
Ниже биологического референтного интервала \порогового значения границы нормы (Приложение А)	Высокий риск первичных иммунодефицитных состояний, с нарушением Т-клеточного звена, и развития тяжелых инфекционных заболеваний (группа риска).	Высокий риск первичных иммунодефицитных состояний, с нарушением В-клеточного звена, и развития тяжелых инфекционных заболеваний (группа риска).
	Рекомендуется подтвердить результат повторным исследованием, начиная с этапа пробоподготовки	
Не определяется (0)	Максимальный риск иммунодефицита и развития тяжелых инфекционных заболеваний (ПИД).	Максимальный риск иммунодефицита и развития тяжелых инфекционных заболеваний (ПИД).
	Рекомендуется подтвердить результат повторным исследованием, начиная с этапа пробоподготовки	
Примечание - При регистрации Ср TREC/KREC ≥ 37, точность определения содержания TREC\KREC может быть снижена, в случае первичного результата – «Условная норма», повторное исследование данного образца СПК выполняется опционально.		

Таблица 5 – Интерпретация результатов исследования 7 экзона гена SMN1

Результат по каналу детекции		**Δ Ср = Ср (Hex) – Ср (Cy5)**	**Интерпретация**
Hex, Ср	**Cy5**, Ср		
Указан	**≤ 31**	**< 6,0 (включая отрицательные значения)**	Не обнаружена делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (N)
Указан	**≤ 31**	От 6,0 до 8,0	Сомнительный результат (?)[1]
Указан	**≤ 31**	**≥ 8,0**	**Обнаружена** делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (del)[2]
Не указан	**≤ 31**	Не учитывается	**Обнаружена** делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (del)[2]
Ср указан/ не указан	Не указан	Не учитывается	Недостоверный результат (нд)
	> 31	Не учитывается	

[1] - при получении сомнительного результата требуется повторное исследование, начиная с этапа пробоподготовки. При воспроизведении сомнительного результата существует высокий риск диагноза СМА и рекомендуется исследование методом количественного MLPA-анализа или секвенирования;
[2] - рекомендуется подтвердить результат повторным исследованием, начиная с этапа пробоподготовки;
N – Не обнаружена делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (определено наличие 1 или более копий экзона 7 гена SMN1);
del – Обнаружена делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (определено 0 копий экзона 7 гена SMN1).

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

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнеров, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

10.1.2 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТаq MAX, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТаq MAX в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С не более 5 суток.

10.1.4 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение и эксплуатация

10.2.1 Условия хранения и эксплуатации набора реагентов приведены в таблицах 6, 7.

Таблица 6 – Условия хранения и эксплуатации Фасовка S, стрипы и Фасовка S, пробирки

Наименование	Условия хранения до и после вскрытия упаковки
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	от 2 °С до 8 °С
ПЦР-буфер	
Минеральное масло	
Положительный контрольный образец № 1	
Положительный контрольный образец № 2	
Крышки для стрипов	
Полимераза ТехноТаq MAX	от минус 18 °С до минус 22 °С

Таблица 7 – Условия хранения и эксплуатации Фасовка А

Наименование	Условия хранения до и после вскрытия упаковки
Смесь для амплификации Стрим	от 2 °С до 8 °С
ПЦР-буфер Стрим-STK	
Минеральное масло	
Положительный контрольный образец №1	
Положительный контрольный образец №2	
Полимераза ТехноТаq MAX	от минус 18 °С до минус 22 °С

10.2.2 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.2.3 Наборы реагентов следует хранить в холодильнике, холодильной или морозильной камере при температурах, указанных в таблицах 6, 7 в течение всего срока годности

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

набора реагентов.

10.2.4 Смесь для амплификации Стрим и смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2°С до 8°С в защищенном от света месте в течение всего срока годности.

10.2.5 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.2.6 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

10.2.7 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

11.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для однократного применения и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

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

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Обратитесь к инструкции по применению
	Предел температуры	REF	Номер по каталогу
Σ	Содержимого достаточно для проведения *n* тестов		Изготовитель
	Использовать до		Не допускать воздействия солнечного света
LOT	Код партии (серии)	NON STERILE	Нестерильно
	Дата изготовления		

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

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ ISO 14971-2021 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям

ГОСТ 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения

ГОСТ Р 2.105-2019 Единая система конструкторской документации. Общие требования к текстовым документам

ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство. Медицинские изделия

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

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

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС» (ООО «ДНК-Технология ТС»), Россия.

Адрес производителя: 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4

Место производства:

ООО «ДНК-Технология ТС»: 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Научный сотрудник
ООО «НПФ ДНК-Технология» А.И. Никифорова
«12» октября 2023г.

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ «НМИЦ АГП
им. В.И. Кулакова» Минздрава России
академик РАН, профессор Г.Т. Сухих
«12» октября 2023 г.

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

Приложение А

Биологический референтный интервал (новорождённые)

Границы референтных интервалов	TREC, копий на 10^5 лейкоцитов	KREC, копий на 10^5 лейкоцитов
Цельная кровь		
Верхняя граница (95% референтный интервал)	4400	4100
Нижняя граница (95% референтный интервал)	650	600
Нижняя граница (99% «левосторонний» референтный интервал)	490	480
Нижняя граница (99,9% «левосторонний» референтный интервал)	320	270
Сухие пятна крови		
Верхняя граница (95% референтный интервал)	2900	3200
Нижняя граница (95% референтный интервал)	460	270
Нижняя граница (99% «левосторонний» референтный интервал)	360	210
Нижняя граница (99,9% «левосторонний» референтный интервал)	210	140
Расширенный неонатальный скрининг:	Пороговое значение нормы устанавливается согласно рекомендациям РНС	

Примечание – Референтный интервал для концентраций TREC и KREC установлен по выборке 3576 сухих пятен крови и 733 образцов цельной крови новорожденных с применением набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC;
для интерпретации результатов исследования допускается привлечение данных нормальных диапазонов TREC и KREC, **пороговых значений**, указанных в медицинских реферируемых изданиях и рекомендациях РНС.

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

Приложение Б

Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» при использовании набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC

1) «Тип анализа» – выбрать «Мультиплекс»;
2) Указать количество контрольных образцов в тесте:
   - Положительный (К+) – 2;
   - Отрицательный (К –) – 1;
3) Указать объём реакционной смеси – 35 мкл;
4) Указать параметры анализа («Дополнительно»):
   - Критерий положительного результата ПЦР: 80%;
   - Критерий достоверности результатов:

   Нижняя граница/порог положительного результата: 10%
   Верхняя граница/порог положительного результата: 30%

5) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	2	00	1		Цикл
	94	5	00			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	10	…	…	Хранение		Хранение

√- режим оптических измерений

6) «Флуорофоры», внести следующие параметры:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Специфика	Специфика	Специфика	ВК	отсутствует

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

ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

Инструкция по применению
НеоСкрин SMA/TREC/KREC

Организация-производитель
СОГЛАСОВАНО
Генеральный директор
ООО «ДНК-Технология ТС»
_____ С.А. Самарин
«12» ноября 2023 г.

Организация-разработчик
УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «НПФ ДНК-Технология»
_____ П. Левичев
«12» ноября 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выявления делеции 7 экзона гена SMN1 и оценки содержания эксцизионных колец Т- клеточного рецептора (TREC) и рекомбинационных колец каппа-делеционного элемента (KREC) у новорожденных методом ПЦР в режиме реального времени (НеоСкрин SMA/TREC/KREC)

Варианты исполнения:

Фасовка S, стрипы, с пробоподготовкой
Фасовка А, с пробоподготовкой

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «ДНК-Технология ТС»
САМАРИН С.А.
ПОДПИСЬ

2023 г.

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

СМА	- спинальная мышечная атрофия
KREC	- от англ. *kappa-deleting recombination excision circle* – рекомбинационное кольцо каппа-делеционного элемента
MLPA	- от англ. multiplex ligation-dependent probe amplification - метод мультиплексной амплификации лигированных зондов
RCF	- от англ. relative centrifugal force - относительное ускорение центрифуги
SMN1	- от англ. *survival of motor neuron* - «ген выживаемости моторных нейронов 1»
SMN2	- от англ. *survival of motor neuron* - «ген выживаемости моторных нейронов 2»
TREC	- от англ. *T cell receptor (TCR) excision circles* – эксцизионное кольцо Т-клеточного рецептора
ВК	- внутренний контроль
ДИ	- доверительный интервал
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы	- дезоксирибонуклеазы
ИВ	- интерферирующие вещества
К-	- отрицательный контрольный образец
К+№1	- положительный контрольный образец № 1
К+№2	- положительный контрольный образец № 2
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
ПИД	- первичные иммунодефициты
ПИДС	- первичные иммунодефицитные состояния
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНКазы	- рибонуклеазы
РНС	- расширенный неонатальный скрининг на наличие наследственных и врождённых заболеваний
СПК	- сухое пятно крови
ТКИН	- тяжёлая комбинированная иммунная недостаточность
ЭДТА	- этилендиаминтетраацетат

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

ВВЕДЕНИЕ

Первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС) представляют собой генетически гетерогенную группу врожденных нарушений иммунитета, большинство из которых проявляется в младенчестве и раннем детском возрасте.

Наиболее опасной формой ПИДС является тяжелый комбинированный иммунодефицит (или тяжёлая комбинированная недостаточность клеточного и гуморального звена иммунитета (ТКИН)). ТКИН характеризуется практически полным отсутствием зрелых Т-лимфоцитов при наличии или отсутствии В- и НК-лимфоцитов, приводит к ранним, крайне тяжелым инфекциям вирусно-бактериальной и оппортунистической природы и в отсутствие патогенетической терапии к смерти в первые два года жизни [1].

До недавнего времени было практически невозможно идентифицировать детей с первичными иммунодефицитными состояниями до их манифестации. В течение последнего десятилетия в практику здравоохранения многих стран активно внедряется определение универсальных маркеров Т-клеточных иммунодефицитов – TREC (T-cell receptor excision circle) и В-клеточных иммунодефицитов – KREC (kappa-deleting recombination excision circle) для скрининга врожденных патологий иммунной системы (скрининг на ПИДС (ТКИН)) [2,3]. Исследование TREC и KREC у новорожденных проводится с использованием сухого пятна капиллярной крови карты неонатального скрининга методом ПЦР в реальном времени [2-7].

TREC и KREC представляют собой внехромосомные кольцевые структуры ДНК, образующиеся в процессе перестройки генов, кодирующих Т- (TCR) и В- (BCR) клеточные рецепторы лимфоцитов и служат маркерами популяций наивных Т- и В-клеток [6,7]. Молекулы TREC и KREC стабильны и не реплицируются во время митоза, что позволяет использовать TREC в качестве суррогатного маркера нормальной пролиферации Т-лимфоцитов в тимусе, а KREC – в качестве маркера нормального развития В-клеточного звена иммунной системы.

Вне зависимости от генетического дефекта низкие уровни TREC и KREC в крови новорожденных указывают на Т- и/или В-клеточную лимфопению, что позволяет применять определение уровней TREC и KREC для ранней диагностики иммунодефицитных состояний [1,2,3,5-7].

К настоящему времени доказана эффективность анализа TREC для верификации тяжелого комбинированного иммунодефицита [1,5,6], комбинированных иммунных нарушений без идентифицируемой молекулярной причины [3], синдромальных иммунодефицитных состояний [3]. Установлена эффективность определения KREC для диагностики врожденных агаммаглобулинемий и других В-клеточных расстройств [5,7].

Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q (СМА) – это тяжелое аутосомно-рецессивное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся прогрессирующими

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

симптомами вялого паралича и мышечной атрофии вследствие дегенерации α-мотонейронов передних рогов спинного мозга. Развитие проксимальной спинальной мышечной атрофии 5q обусловлено мутациями в гене SMN1, кодирующем белок выживаемости мотонейронов. Ген SMN1 картирован на хромосоме 5 в локусе 5q12.2-q13.3 и имеет центромерную копию (SMN2). Оба гена состоят из девяти экзонов и различаются пятью нуклеотидами в последовательности ДНК. Вследствие различий в нуклеотидной последовательности основной транскрипт гена SMN2 является функционально неполноценным [8,9].

Потеря экзонов 7 или 7-8 гена SMN1 (по типу истиной делеции или конверсии) в гомозиготном состоянии является наиболее частой причиной СМА 5q [8,9,10].

СМА входит в число частых наследственных заболеваний. Общепопуляционная распространенность проксимальной спинальной мышечной атрофии составляет 1 на 6000 – 10000 новорожденных [9,11].

Для диагностики СМА используется комплекс методов обследования, включающий генеалогический анализ, неврологический осмотр, электронейромиографию. В настоящее время приоритетным диагностическим методом при подозрении на СМА является генетическое тестирование [8,9,11]. Рекомендуется проводить молекулярно-генетическое исследование мутаций в гене SMN1 всем пациентам с подозрением на СМА 5q с целью выявления делеции экзонов 7 или 7-8 и молекулярно-генетического подтверждения диагноза [8]. Диагноз СМА подтверждается при обнаружении делеции 7 экзона или 7-8 экзонов гена SMN1 в гомозиготном состоянии (т. е. в обеих копиях гена) [8].

Генетический скрининг новорожденных на СМА позволяет обнаружить наличие мутации гена SMN1 в первые недели жизни ребенка, до появления первых симптомов, своевременно начать лечение, смягчить течение заболевания, при применении патогенетической терапии избежать инвалидизации пациента.

Список литературы

1. Румянцев А.Г., Масчан А.А., Щербина А.Ю. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению детей с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью. 2015.

2. Blom M., Bredius R. G. M., Weijman G., Dekkers E. H. B. M., Kemper E. A. [et al.]. Introducing Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency (SCID) in the Dutch Neonatal Screening Program. Int. J. Neonatal Screen. 2018;4(4):40.

3. Kwan A., Abraham R. S., Currier R., Brower A., Andruszewski K. [et al.]. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. JAMA.2014;312:729-738.

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

4. Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В., Зимин С.Б., Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Смирнова А.С., Никитина И.А., Корсунский И.А., Филипенко М.Л., Продеус А.П. Разработка набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 467-478.

5. И.А. Корсунский, Д.А. Кудлай, А.П. Продеус, А.Ю. Щербина, А.Г. Румянцев. Неонатальный скрининг на первичные иммунодефицитные состояния и Т-/В-клеточные лимфопении как основа формирования групп риска детей с врожденными патологиями. Педиатрия. 2020; 99 (2): 8-15.

6. van Zelm MC, van der Burg M, Langerak AW, van Dongen JJ. PID comes full circle: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. Front Immunol. 2011 May 4; 2:12.

7. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M [et al.]. Quantification of κ-deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. J. Allergy Clin. Immunol. 2011; 128 (1): 223-225.

8. Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q Клинические рекомендации МЗ РФ. 2020.

9. Забненкова В.В., Дадали Е.Л., Поляков А.В. Проксимальная спинальная мышечная атрофия типов I—IV: особенности молекулярно-генетической диагностики. Нервно-мышечные болезни. 2013; 3:27-31.

10. Диль А.В., Назаров В.Д., Сидоренко Д.В., Лапин С.В., Эмануэль В.Л. Исследование особенностей генетических изменений гена SMN1 при спинальной мышечной атрофии 5q. Нервно-мышечные болезни. 2022; 12 (3): 36-44.

11. Гайдук А.Я., Власов Я.В. Спинальные мышечные атрофии в Самарской области: эпидемиология, классификация, перспективы оказания медицинской помощи. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2019;119(12):88-93.

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

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 **Полное наименование набора реагентов:** Набор реагентов для выявления делеции 7 экзона гена SMN1 и оценки содержания эксцизионных колец Т- клеточного рецептора (TREC) и рекомбинационных колец каппа-делеционного элемента (KREC) у новорожденных методом ПЦР в режиме реального времени (НеоСкрин SMA/TREC/KREC), далее по тексту - набор реагентов.

1.2 **Назначение:** набор реагентов предназначен для выявления гомозиготной делеции 7 экзона гена SMN1 и относительной количественной оценки содержания эксцизионных колец Т-клеточного рецептора (TREC) и рекомбинационных колец каппа-делеционного элемента (KREC) в биологическом материале новорожденных (цельная кровь, сухие пятна крови) в целях проведения скрининга на спинальную мышечную атрофию и первичные иммунодефициты методом ПЦР в режиме реального времени.

1.3 **Функциональное назначение:** скрининг.

1.4 **Показания к проведению анализа:** скрининг новорожденных на проксимальную спинальную мышечную атрофию (СМА) и первичные иммунодефициты (ПИД), ассоциированные с нарушениями Т- и В-клеточного звеньев иммунной системы (формирование групп риска новорождённых). Противопоказаний к применению нет.

1.5 **Популяционные и демографические аспекты:** набор реагентов предназначен для скрининга новорожденных детей, применение не зависит от популяционных аспектов.

1.6 **Область применения:** набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

1.7 **Потенциальные пользователи:** квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

1.8 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF R2-H810-S3/9, фасовка S, стрипы, с пробоподготовкой			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок/ планшетов/ флаконов	Номинальный объём компонента
Часть 1 из 3			
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная пенящаяся жидкость	1 флакон	28,8 мл
Сорбент	Жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 планшет	96 лунок по 250 мкл
Промывочный раствор № 1	Прозрачная голубая пенящаяся жидкость	1 планшет	96 лунок по 300 мкл
Промывочный раствор № 2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 планшет	96 лунок по 700 мкл
Элюирующий раствор	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 планшет	96 лунок по 70 мкл
Планшет глубоколуночный 96 лунок для образцов СПК	1 шт.		
Планшет глубоколуночный 96 лунок для предобработанных образцов	1 шт.		
Планшет глубоколуночный 96 лунок [1]	1 шт		
Насадка на магнитные стержни 96	2 шт		
Пленка для заклеивания планшета [2]	1 шт		
Часть 2 из 3			
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец № 1 [3]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Положительный контрольный образец № 2 [4]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		
Часть 3 из 3			
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	50 мкл

[1] - для размещения насадки на магнитные стержни
[2] - для заклеивания планшета с выделенными нуклеиновыми кислотами при хранении
[3] - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец № 1» указывается как «К+ №1»
[4] - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец № 2» указывается как «К+ №2»

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

REF R2-H810-MA/9, фасовка А, с пробоподготовкой			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок/ планшетов/ флаконов	Номинальный объём компонента
Часть 1 из 3			
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная пенящаяся жидкость	1 флакон	28,8 мл
Сорбент	Жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 планшет	96 лунок по 250 мкл
Промывочный раствор № 1	Прозрачная голубая пенящаяся жидкость	1 планшет	96 лунок по 300 мкл
Промывочный раствор № 2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 планшет	96 лунок по 700 мкл
Элюирующий раствор	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 планшет	96 лунок по 70 мкл
Планшет глубоколуночный 96 лунок для образцов СПК	1 шт.		
Планшет глубоколуночный 96 лунок для предобработанных образцов	1 шт.		
Планшет глубоколуночный 96 лунок [1]	1 шт.		
Насадка на магнитные стержни 96	2 шт.		
Пленка для заклеивания планшета [2]	1 шт.		
Часть 2 из 3			
Смесь для амплификации Стрим	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	2 пробирки	по 50 мкл
ПЦР-буфер Стрим-STK	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 1,4 мл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец № 1 [3]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	100 мкл
Положительный контрольный образец № 2 [4]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	100 мкл
Стрипы по 8 пробирок	12 шт.		
Крышки для стрипов	12 шт.		
Часть 3 из 3			
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2 пробирки	по 25 мкл

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

[1] - для размещения насадки на магнитные стержни
[2] - для заклеивания планшета с выделенными нуклеиновыми кислотами при хранении
[3] - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец №1» указывается как «К+ №1»
[4] - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец №2» указывается как «К+ №2»

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

Комплект поставки включает:

- Набор реагентов в одном из вариантов исполнения – 1 шт.;
- Инструкция по применению – 1 экз.;
- Паспорт – 1 экз.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S, стрипы, с пробоподготовкой:

Часть 1 предназначена для однократного применения (1 постановка) и рассчитана на выделение нуклеиновых кислот из 96 анализируемых образцов, включая неизвестные образцы и контрольные образцы. Часть 2 и Часть 3 рассчитаны на 96 определений (не более 24 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

Набор реагентов в фасовке A, с пробоподготовкой:

Часть 1 предназначена для однократного применения (1 постановка) и рассчитана на выделение нуклеиновых кислот из 96 анализируемых образцов, включая неизвестные образцы и контрольные образцы. Часть 2 и Часть 3 рассчитаны на 96 определений (не более 5 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода

Метод: мультиплексная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный анализ (7 экзон гена SMN1), относительный количественный анализ (ДНК TREC, KREC).

Принцип метода основан на амплификации участков ДНК TREC, KREC, 7 экзона гена SMN1 и фрагмента нормировочного гена (эндогенный внутренний контроль (ВК)) с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина и/или использованием Taq-полимеразы, блокированной антителами. Старт полимеразной цепной реакции происходит только при расплавлении парафина и/или температурной диссоциации комплекса Taq-полимеразы и антител, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

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

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

Для амплификации 7 экзона SMN1 применяется зонд-праймер, 3'-конец которого строго соответствует последовательности начального фрагмента 7 экзона гена SMN1, но различается с аналогичным фрагментом гена SMN2.

В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации ДНК TREC, включена флуоресцентная метка Fam.

В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации ДНК KREC включена, флуоресцентная метка Rox.

В состав зонда-праймера, использующегося для амплификации и детекции продукта амплификации целевого фрагмента гена SMN1, включена флуоресцентная метка SIMA (регистрация амплификации выполняется по каналу детекции Hex).

В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации фрагмента гена эндогенного внутреннего контроля (ВК), включена флуоресцентная метка Cy5.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок и биоматериала, необходимого для проведения исследования, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке. В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5
TREC	SMN1 (7 экзон SMN1)	KREC	ВК*

* ВК – эндогенный внутренний контроль, представляет собой однокопийный геномный локус, служит для оценки геном-эквивалентов ядросодержащих клеток (лейкоцитов) крови и контроля качества препарата ДНК.

Содержание TREC и KREC в неизвестном образце оценивается по формулам:

1. Содержание ***TREC*** **(копий на 10^5 лейкоцитов)** $= 10^{((Cp\,BK - Cp\,TREC)/3{,}4)} \times 200000$ (1)

где Ср ВК – значение индикаторного цикла (Ср) ВК;

где Ср TREC – значение индикаторного цикла (Ср) TREC.

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

Если значение Ср TREC для образца не указано, содержание TREC составляет 0 копий на 10^5 лейкоцитов.

2. Содержание ***KREC*** **(копий на 10^5лейкоцитов)** $= 10^{((\text{Ср } BK - \text{Ср } KREC)/3{,}4)} \times 200000$ (2)

где Ср ВК – значение индикаторного цикла (Ср) ВК;

где Ср KREC – значение индикаторного цикла (Ср) KREC.

Если значение Ср KREC для образца не указано, содержание KREC составляет 0 копий на 10^5 лейкоцитов.

Анализ делеции 7 экзона SMN1 основан на оценке разницы индикаторного цикла (Δ Ср) между значениями Ср SMN1 (канал детекции Hex) и Ср ВК (канал детекции Cy5) (**Δ Ср = Ср (Hex) – Ср (Cy5)**).

Ограничение метода:

Для корректной оценки содержания эксцизионных колец TREC и KREC и генотипирования по 7 экзону гена SMN1 количество геномной ДНК на амплификационную пробирку должно составлять не менее 1,0 нг геномной ДНК (допустимое значение Ср по каналу детекции Cy5 (ВК) ≤ 31).

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификация ДНК с одновременной детекцией результатов с использованием набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC.

Реагенты для выделения ДНК включены в состав набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC в вариантах исполнения: фасовка S, стрипы, с пробоподготовкой, фасовка A, с пробоподготовкой.

2.4 Время проведения анализа (с учетом пробоподготовки): от 2,5 часов (в зависимости от количества образцов).

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

3 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

3.1 Специфичность анализа

В образцах биологического материла, содержащих ДНК TREC, KREC, 7 экзона гена SMN1, гена ВК, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по заявленным каналам детекции.

В образцах биологического материала человека, не содержащего ДНК TREC, KREC, 7 экзона гена SMN1, при проведении амплификации экспоненциальный рост флуоресценции по заявленным каналам детекции отсутствует или ниже фонового значения; возможна регистрация экспоненциального роста уровня флуоресценции по каналу детекции Hex в случае гомозиготной делеции 7 экзона гена SMN1 при условии разницы между значениями Ср по каналу детекции Hex и Ср по каналу детекции Cy5 (Δ Ср) $\geq$ 8.

В ходе НИОКР была проведена проверка специфичности набора реагентов биоинформатическими методами. Показано отсутствие перекрестных неспецифических реакций для каждой из систем олигонуклеотидов (TREC, KREC, SMN1, ВК), входящих в состав набора реагентов.

Аналитическая специфичность набора регентов подтверждена с использованием генно-инженерных конструкций (рекомбинантных плазмид) соответствующих последовательностям ДНК выявляемых показателей (TREC, KREC, SMN1, ВК).

Специфичность детекции ДНК TREC, KREC в присутствии геномной (хромосомной) ДНК подтверждена при тестировании препаратов ДНК клеточной линии Hela, для которой не характерна перестройка генов Т- и В-клеточных рецептов и наличие кольцевых молекул TREC и KREC.

Специфичность выявления делеции 7 экзона SMN1 в гомозиготном состоянии установлена с применением двух вариантов генно-инженерных конструкций, соответствующих 7 экзону SMN1 и SMN2 генов, а также подтверждена на клиническом материале.

Набор реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC позволяет выявлять потери 7 экзона гена SMN1 по типу истинных делецией (делеции 7 экзона и 7-8 экзонов) или генной конверсии c.850C>T (конверсия SMN1 в SMN2) в гомозиготном состоянии (см. 3.6.2.).

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных и недостоверных результатов. Признаками ингибирования ПЦР являются отсутствие кривой накопления внутреннего контроля, искажение ее формы (кривая накопления

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

не имеет типичной s-образной формы, не достигает плато, имеет пологий характер) либо резкий сдвиг по шкале Ср вправо.

К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец биологического материала, относятся интерферирующие вещества эндогенной природы – гемоглобин, билирубин, холестерин и триглицериды. Предельные допустимые концентрации потенциальных интерферирующих веществ в образце исходного биоматериала приведены в таблице 2.

К потенциальным экзогенным ингибиторам в препаратах ДНК отнесены: промывочный раствор №2 и крезоловый красный в составе элюирующего раствора. При строгом соблюдении инструкций по применению рекомендованных наборов реагентов для выделения ДНК эффекта ингибирования ПЦР промывочного раствора и крезоловый красный промывочным раствором и крезоловым красным не наблюдается.

Примечание – Максимальное количество промывочного раствора №2, при котором не наблюдалось ингибирование ПЦР, составляет не более 12,5% от объёма препарата ДНК. Максимальное количество крезолового красного, при котором не наблюдалось ингибирование ПЦР, составляет не более 0,0125 мг/мл.

Таблица 2– Предельные допустимые концентрации потенциальных интерферирующих веществ в образце исходного биоматериала

Вид биоматериала	Интерферирующее вещество	Исследованная концентрация в образце
Сухие пятна крови	Гемоглобин	250 г/л
	Билирубин	500 мкмоль/л
	Холестерин	12 ммоль/л
	Триглицериды	500 мг/л

Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия биологического материала (см. 6.2).

В случае наличия в образце ПЦР-ингибирующих примесей рекомендуется либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

3.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения TREC и KREC

- 5 копий на 10^5 лейкоцитов (при Ср Cy5 <28)
- 10^3 копий на 10^5 лейкоцитов (при Ср Cy5 $28 \leq Ср \leq 31$)

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

Аналитический предел обнаружения (амплификатор регистрирует положительный результат) составляет 5 копий на амплификационную пробирку для каждого аналита (TREC, KREC, SMN1 и BK).

3.4 Диапазон измерения TREC и KREC

- $15 – 10^5$ копий на 10^5 лейкоцитов (при Ср Cy5 < 28)
- $10^3 – 10^5$ копий на 10^5 лейкоцитов (при Ср Cy5 $28 \leq Ср \leq 31$)

3.5 Характеристики точности

3.5.1 Повторяемость и воспроизводимость определения содержания TREC и KREC (Lg копий/10^5 лейкоцитов): коэффициент вариации (%CV) составляет ≤10.

3.5.2 Правильность определения содержания TREC и KREC (Lg копий/10^5 лейкоцитов): относительная погрешность (δx) составляет ≤5%.

3.5.3 Предельная ошибка (аналитическая) определения содержания TREC и KREC составляет ±0,1 Lg копий/10^5 лейкоцитов.

3.5.4 Предел точности определения содержания TREC и KREC составляет ±0,3 Lg копий/10^5 лейкоцитов.

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

3.6 Диагностические характеристики

3.6.1 Диагностические характеристики определения показателей TREC и KREC

	TREC	KREC
Количество образцов	61	61
Диагностическая чувствительность (ДИ95%)	100.00% (88.78%-100.00%)	93.33% (68.05%-99.83%)
Диагностическая специфичность (ДИ95%)	100.00% (88.43%-100.00%)	97,83% (88.47%-99.95%)

Примечание – При использовании набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC:

- при оценке содержания эксцизионных колец Т-клеточного рецептора (TREC) положительным результатом считали **отсутствие или значение менее нижнего предела референтного интервала** эксцизионных колец Т-клеточного рецептора (TREC);
- при оценке содержания рекомбинационных колец каппа-делеционного элемента (KREC) положительным результатом считали **отсутствие или значение менее нижнего предела референтного интервала** рекомбинационных колец каппа-делеционного элемента (KREC).

3.6.2 Диагностические характеристики по показателю делеция 7 экзона SMN1 в гомозиготном состоянии

Результаты определения делеции 7 экзона SMN1 набором реагентов:

Характеристика группы на основе данных MLPA по числу копий экзонов 7 и 8 генов SMN1 и SMN2 и варианта изменений гена SMN1	**Число образцов**	**Результат НеоСкрин SMA/TREC/KREC экзон 7 гена SMN1**	
		≥ 1 копии (N)	**0 копий (del)**
Условная норма: количество SMN1 – 2 копии, количество SMN2 – 2 копии.	54	54	0
Дупликация гена (SMN1): количество SMN1 – 3 копии, количество SMN2 – 0-3 копии	23	23	0
Носительство делеции гена (SMN1): количество SMN1 – 1 копия, количество SMN2 – 0-4 копии	51	51	0
Истинная гомозиготная делеция гена (SMN1)[1]: количество SMN1 – 0 копий, количество SMN2 – 2 копии.	9	0	9
Конверсия гена (SMN1)[1]: количество SMN1 – 0 копии, количество SMN2 – 3 - 4 копии	47	0	47
Гибридные гены SMN1/SMN2 с частичной делецией гена SMN1[1]: количество экзона 7 SMN1 - 0 копий.	9	0	9
Носительство делеции 7 экзона гена SMN1 и гетерозиготная точечная мутация гена SMN1 (c.815A> G, rs104893922)[2]	1	1	0
Прочие варианты[1] сочетания копий генов \ копий экзона 7 и 8 SMN1 и SMN2.	13	11	2
Всего	**207**	**140**	**67**

[1] - группы, включающие образцы с патогенным вариантом изменениями гена SMN1 (делеции и\или конверсии экзона 7 гена SMN1) в гомозиготном состоянии (генетический диагноз СМА 5q);
[2] — точечная патогенная мутация установлена методами секвенирования гена SMN1 (сочетание носительства делеции и патогенной мутации во второй копии гена SMN1 - генетический диагноз СМА 5q);
N – Не обнаружена делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (определено наличие 1 или более копий экзона 7 гена SMN1);
del – Обнаружена делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (определено 0 копий экзона 7 гена SMN1).

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

	Делеция 7 экзона SMN1 в гомозиготном состоянии
Количество образцов	207
Диагностическая чувствительность (ДИ95%)	100.00% (94.64%- 100.00%)
Диагностическая специфичность (ДИ95%)	100.00% (97.40%-100.00%)

Примечание – Для набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC при оценке 7 экзона гена SMN1 положительным результатом считали **обнаружение** делеции 7 экзона гена SMN1 **в гомозиготном состоянии.**

3.7 Воспроизводимость результатов

Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость результатов подтверждена при проведении клинико-лабораторных испытаний при исследовании 20 образцов с использованием двух наборов реагентов одной серии и одного набора реагентов второй серии и разных детектирующих амплификаторов. Для всех образцов получено 100% совпадение результатов (ДИ95% составляет 97,84–100% по каждому показателю).

Критерии совпадения результатов:

7 экзон SMN1: совпадение результата определения делеции 7 экзона гена SMN1; TREC: абсолютное значение отклонения показателя TREC не более 0,3 десятичного логарифма; KREC: абсолютное значение отклонения KREC не более 0,3 десятичного логарифма.

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

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, 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», с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Неизвестные образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька.

При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

К работе с набором реагентов допускается персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

Подготовку биологического материала и выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводятся выделение ДНК и постановка ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР (МУ 1.3.2569-09).

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

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских 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».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасного компонента	Указание на риски
Лизирующий раствор	Гуанидина тиоцианат	H302, H312, H332, H412
	Тиоглицерол	H302, H312, H315, H319, H332
	Тритон X-100	H302, H314, H319, H412
	IGEPAL CA-630	H302, H315, H319, H412
Промывочный раствор № 1	Гуанидина тиоцианат	H302, H312, H332, H412
	Тритон X-100	H302, H314, H319, H412
	IGEPAL CA-630	H302, H315, H319, H412
Промывочный раствор № 2	Азид натрия менее 0,1%	Является безопасным для конечного пользователя
Элюирующий раствор	Азид натрия менее 0,1%	Является безопасным для конечного пользователя
Сорбент	Азид натрия менее 0,1%	Является безопасным для конечного пользователя
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	IGEPAL CA-630	H302, H315, H319, H412
Смесь для амплификации Стрим	Азид натрия менее 0,1%	Является безопасным для конечного пользователя
ПЦР-буфер	IGEPAL CA-630	H302, H315, H319, H412
ПЦР-буфер Стрим-STK	IGEPAL CA-630	H302, H315, H319, H412
Полимераза Техно Taq MAX	Нет опасных веществ	-
Минеральное масло	Нет опасных веществ	-
Положительный контрольный образец № 1	Азид натрия менее 0,1%	Является безопасным для конечного пользователя
Положительный контрольный образец № 2	Азид натрия менее 0,1%	Является безопасным для конечного пользователя

Расшифровка обозначений: H302 – Вредно при проглатывании; H312 – Вредно при контакте с кожей; H314 – При попадании на кожу и глаза вызывает химические ожоги; H315 – Вызывает раздражение кожи; H319 – Вызывает раздражение глаз; H332 – Вредно при вдыхании; H412 – Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.

При работе с набором реагентов следует использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно

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

вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, не глотать. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;
- по истечению срока годности набора реагентов.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

Оборудование и расходные материалы	Фасовка S	Фасовка A
Часть 1. Для подготовки биологического материала и выделения ДНК:		
бокс биологической безопасности II класса		
система для автоматического выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологических образцов человека Auto-Pure 96 (Hangzhou Allsheng Instrument Co., LTD, Китай; РУ № РЗН 2022/16430)[1]		
автоматический или ручной перфоратор для выбивания дисков из образцов СПК 3,0-3,2 мм диаметром		
глубоколуночный планшет 96 лунок, 2,2 мл (для размещения и предобработки дисков СПК)		
холодильник		
центрифуга с RCF(g) не менее 150, ротором бакетного типа и адаптером для глубоколуночных планшетов 96 лунок		
дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объёмы жидкости до 1000 мкл		
дозаторы механические или электронные переменного объёма восьмиканальные, позволяющие отбирать объёмы жидкости до 300 мкл		
одноразовые наконечники для полуавтоматических дозаторов, свободные от ДНКаз и РНКаз, объёмом 300 мкл, 1000 мкл		
штатив для дозаторов		
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные		
контейнер для сброса использованных наконечников и других расходных материалов;		
дезинфицирующее средство		
Части 2, 3. Для подготовки и проведения ПЦР:		
	Фасовка S	**Фасовка A**
ПЦР-бокс	да	да[2]
Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм *M*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229	да	да
Амплификатор детектирующий «ДТлайт» (модификация «ДТпрайм *S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228	да	да[3]
микроцентрифуга-вортекс	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	да[3]
холодильник с морозильной камерой	да	да
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	да[3]
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	да[2]
штатив «рабочее место» для юбочных пробирок объёмом 2,0 мл	нет	да[2]
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл; 200–1000 мкл	да	да[2]
дозаторы механические или электронные многоканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 0,5–10 мкл	да	да[2]
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 10 мкл, 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	да[2]

[1] - далее по тексту – система для выделения Auto-Pure 96

[2] - только для ручного дозирования

[3] - только для ручного дозирования с использованием стрипов

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

Части 2, 3. Для подготовки и проведения ПЦР:		
	Фасовка S	**Фасовка A**
штатив для дозаторов	да	да[1]
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл; 2,0 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	да[1]
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да
Устройство дозирующее ДТстрим в варианте исполнения *М4, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982	нет	да[2]
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	нет	да[2]
устройство для запечатывания планшетов ДТпак (ООО «НПО ДНК-Технология»)	нет	да[3]
центрифуга с RCF(g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов	нет	да[3]
полимерная термопленка для запечатывания микропланшетов 96 лунок	нет	да[3]
микропланшет ПЦР 96 лунок[4]	нет	да

[1] только для ручного дозирования
[2] - только для автоматизированного дозирования
[3] - при использовании микропланшетов
[4] - не используется для детектирующего амплификатора «ДТлайт»

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

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют сухие пятна крови.

Ограничение метода - внутривенные инъекции гепарина, инфузии препаратов для парентерального питания менее чем за 6 часов до исследования.

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 и СанПиН 3.3686-21.

6.2 Взятие материала на исследование

ВНИМАНИЕ! Перед выделением ДНК требуется предварительная подготовка образцов биологического материала (см. 6.4).

Взятие крови новорожденных для получения сухого пятна крови осуществляют в соответствии с рекомендациями по забору крови при проведении массового обследования новорожденных детей на наследственные заболевания и инструкциями производителей к бумажным фильтровальным тест-бланкам[1], зарегистрированным в установленном порядке.

На бумажный носитель (тест-бланк) наносится кровь в количестве, достаточном для получения пятна диаметром не менее 1,0 см, при этом кровь должна пропитать бумагу насквозь. После нанесения образца тест-бланк высушивается в горизонтальном положении на чистой обезжиренной поверхности в течение не менее 2 часов без применения дополнительной тепловой обработки.

ВНИМАНИЕ! Не допускается прямое попадание солнечных лучей (ультрафиолета), тепловое воздействие и попадание влаги на образцы СПК во время высушивания и хранения!

6.3 Транспортирование и хранение образцов биологического материала

Для предотвращения загрязнения и перекрёстной контаминации тест-бланки с пятнами крови после просушивания индивидуально упаковываются.

Транспортировка и хранение образцов сухих пятен крови на тест-бланках проводится в соответствии с инструкциями производителей.

---

[1] - в ходе клинических испытаний производителем были валидированы следующие бумажные фильтровальные тест-бланки: Карта для забора и транспортировки биологического материала по ТУ 9398-001-63802255-2016, ООО «Гринвэн», Россия (РУ № РЗН 2017/6431).

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

6.4 Подготовка сухих пятен крови для выделения ДНК.

ВНИМАНИЕ! Для выделения ДНК требуется три диска образца сухой крови диаметром 3,0–3,2 мм.

6.4.1 Промаркируйте пустой глубоколуночный планшет, предназначенный для заполнения образцами СПК (входит в состав набора реагентов - Планшет глубоколуночный 96 лунок для образцов СПК)[1].

6.4.2 С помощью специального автоматического или ручного перфоратора выбейте в лунку планшета три диска диаметром 3,0 – 3,2 мм из пятна сухой крови пациента, повторите процедуру для каждого следующего образца.

6.4.3 Заполните соответствующие лунки глубоколуночного планшета дисками образцов СПК. В лунки планшета, предназначенные для отрицательного контрольного образца (К-), бумажные диски не вносятся.

ВНИМАНИЕ!

1. Заполнение планшета дисками рекомендуется выполнять с учетом количества контрольных образцов, предусмотренных в исследовании НеоСкрин SMA/TREC/KREC (в постановке должны присутствовать 2 положительных контрольных образца («К+ №1», «К+ №2») и 1 отрицательный контрольный образец (К-)), таким образом дисками СПК могут быть заполнены 93 из 96 лунок планшета).
2. Выбитые диски должны быть полностью пропитаны кровью. Рекомендуется выбивать диски из центральной области пятна, не захватывая область ограничивающей краски.
3. При использовании ручного перфоратора для снижения риска кросс-контаминации проб перед выбиванием дисков из каждого нового образца СПК рекомендуется делать 2–3 высечки на чистом участке фильтровальной бумаги.

[1] - маркировка может быть нанесена с использованием перманентного (несмываемого и нестираемого) маркера или этикетки со штрихкодом.

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

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

ВНИМАНИЕ!

1. Манипуляции с СПК должны проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил аналогично образцам, содержащим кровь и другие биологические жидкости.
2. На этапах подготовки биоматериала и выделении из него ДНК используйте одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.
3. При добавлении реагентов в лунку, содержащую биологический материал, аккуратно вносите раствор, не касаясь стенок лунки. При касании стенки лунки смените наконечник.
4. Неизвестные образцы и отрицательный контрольный образец (К-) необходимо обрабатывать по единой схеме одновременно согласно данной инструкции.
5. В лизирующем растворе и промывочном растворе №1 при хранении в холодильнике (от 2 °С до 8 °С) допускается выпадение осадка. В случае выпадения осадка поместите на термостат, предварительно прогретый до 65 °С, флакон или планшет и прогревайте до полного растворения осадка. Перед использованием охладите растворы до комнатной температуры (от 18 °С до 25 °С). Осадок также можно растворить при комнатной температуре в течение приблизительно 12 часов.

7.1.1 Предобработка образцов (дисков сухих пятен крови), Часть 1 из 3.

7.1.1.1 Внесите в каждую лунку планшета с дисками сухих пятен крови (см. 6.4.1 - 6.4.3) (включая лунку для отрицательного контрольного образца (К-)) по 300 мкл лизирующего раствора.

7.1.1.2 Подготовьте систему для выделения Auto-Pure 96 к процедуре предобработки образцов СПК, установив глубоколуночный планшет с образцами СПК и планшет с насадкой на магнитные стержни согласно схеме в Приложении А и руководству по эксплуатации системы для выделения Auto-Pure 96.

7.1.1.3 Проведите предобработку образцов с использованием системы для выделения Auto-Pure 96.

7.1.1.4 Дождитесь окончания работы системы для выделения Auto-Pure 96. Извлеките планшет с предобработанными образцами из системы для выделения Auto-Pure 96. Сохраните планшет для размещения насадки на магнитные стержни его для проведения следующего этапа –выделения ДНК (см. 7.1.2).

7.1.1.5 После извлечения планшета с предобработанными образцами из системы для выделения Auto-Pure 96 дождитесь его охлаждения до комнатной температуры (от 18 °С до 25 °С).

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

7.1.1.6 Промаркируйте пустой глубоколуночный планшет 96 лунок для переноса предобработанных образцов (входит в состав набора реагентов – Планшет глубоколуночный 96 лунок для предобработанных образцов)[1].

7.1.1.7 Максимально полно отберите жидкость из каждой лунки планшета (включая лунку с отрицательным контрольным образцом), не упираясь наконечником в бумажные диски, и перенесите её в соответствующие лунки глубоколуночного планшета для переноса образцов (отдельным наконечником для каждой лунки).

7.1.2 Выделение ДНК из предобработанных образцов сухих пятен крови. Часть 1 из 3.

7.1.2.1 Промаркируйте планшет с элюирующим раствором[1].

7.1.2.2 Центрифугируйте глубоколуночный планшет с сорбентом, промывочным раствором №1, промывочным раствором №2, элюирующим раствором (далее глубоколуночные планшеты с реагентами) при RCF(g) 150 в течение 30 с.

7.1.2.3 Удалите с глубоколуночных планшетов с реагентами защитную пленку.

7.1.2.4 Установите подготовленные глубоколуночные планшеты с реагентами, глубоколуночный планшет №1 (с образцами) и глубоколуночный планшет с насадкой на магнитные стержни (см. 7.1.1.4) согласно схеме в Приложении А и руководству по эксплуатации к системе для выделения Auto-Pure 96.

7.1.2.5 Проведите выделение ДНК с использованием системы для выделения Auto-Pure 96.

7.1.2.6 Дождитесь окончания работы системы для выделения Auto-Pure 96.

Препарат ДНК готов для проведения ПЦР (находится в планшете с элюирующим раствором). При хранении планшета с выделенной ДНК используйте пленку для заклеивания планшета.

Полученный препарат ДНК можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более семи суток или при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца. Если препараты ДНК хранились от минус 18 °С до минус 22 °С, то их следует разморозить при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) или при температуре от 2 °С до 8 °С.

ВНИМАНИЕ!

1. Допускается только однократное размораживание препарата ДНК!
2. Перед внесением препарата ДНК в пробирки со смесью для амплификации после размораживания следует центрифугировать глубоколуночный планшет с препаратами

[1] - маркировка может быть нанесена с использованием перманентного (несмываемого и нестираемого) маркера или этикетки со штрихкодом.

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

ДНК при RCF(g) 150 в течение 30 с, снять защитную плёнку и перемешать их пипетированием 3-5 раз.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S, Часть 2 из 3 и Часть 3 из 3

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
2. При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы, с пробоподготовкой», следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.2.1 Промаркируйте по одной стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого неизвестного образца, отрицательного контрольного образца (К–), положительного контрольного образца № 1 (К+№1) и положительного контрольного образца № 2 (К+№2).

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 24 постановки при условии вариабельного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 2 положительных контрольных образцов в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 5 пробирок для неизвестных образцов; одну пробирку для отрицательного контрольного образца «К–» и две пробирки для положительных контрольных образцов «К+№1», «К+№2». Общее количество пробирок – 8.

7.2.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаq MAX на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq MAX следует доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.3 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq MAX. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

- 10×(N+1) мкл ПЦР–буфера;
- 0,5×(N+1) мкл полимеразы ТехноТаq MAX,

где N — количество промаркированных пробирок с учётом «К-», «К+№1» и «К+№2».

Пример:

Необходимо проанализировать 5 неизвестных образцов, «К-», «К+№1» и «К+№2». Промаркированных пробирок – 8.

Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX для 9 (8+1) пробирок, т.е. 90 мкл ПЦР-буфера + 4,5 мкл полимеразы ТехноТаq MAX.

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

7.2.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.2.5 Добавьте во все промаркированные пробирки (включая «К-», «К+№1» и «К+№2»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ.

ВНИМАНИЕ! Не допускается хранение стрипов со смесью для амплификации после добавления в них смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ, после дозирования необходимо сразу выполнить 7.2.6- 7.2.12.

7.2.6 Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте стрипы.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Закрывайте стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.7 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К-», «К+№1» и «К+№2», ДНК не вносится.

7.2.8 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

7.2.9 Внесите в пробирки, промаркированные «К+№1», «К+№2», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл соответствующего положительного контрольного образца.

7.2.10 Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.2.11 Установите все стрипы в блок детектирующего амплификатора.

7.2.12 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест[1]. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в Приложении Б.

[1] - тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов.

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

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А с использованием дозирующего устройства ДТстрим, Часть 2 из 3 и Часть 3 из 3 (только для детектирующего амплификатора ДТпрайм)

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
2. Фасовка А с использованием дозирующего устройства ДТстрим предназначена для одновременной постановки 96 образцов, включая контрольные образцы.

7.3.1 Подготовьте и промаркируйте 12 стрипов\ 96 стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл (входят в состав набора реагентов) или микропланшет ПЦР 96 лунок (не входит в состав набора реагентов), для неизвестных образцов, отрицательного контрольного образца «К-» и положительных контрольных образцов «К+№1», «К+№2».

7.3.2 Тщательно перемешайте содержимое пробирок со смесью для амплификации Стрим, ПЦР-буфером Стрим-STK и положительными контрольными образцами «К+№1», «К+№2» на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.3.3 Центрифугируйте пробирки с минеральным маслом и полимеразой ТехноТаq MAX на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq MAX необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.4 Установите пробирки со смесью для амплификации Стрим, ПЦР-буфером Стрим-STK, минеральным маслом, полимеразой ТехноТаq MAX и положительными контрольными образцами «К+№1», «К+№2» на рабочий стол ДТстрим, снимите крышки пробирок.

ВНИМАНИЕ! Сохраняйте крышки пробирок от реагентов и положительных контрольных образцов до окончания дозирования. Перед утилизацией необходимо закрыть пробирки крышками.

7.3.5 Установите планшет с образцами ДНК, штативы с наконечниками, а также стрипы или микропланшет 96 лунок на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно сценарию для набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC в варианте исполнения фасовка А.

7.3.6 В случае использования микропланшетов 96 лунок:

7.3.6.1 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет 96 лунок в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак.

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

7.3.6.2 Проведите запечатывание микропланшета 96 лунок полимерной термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.3.6.3 Центрифугируйте микропланшет 96 лунок при RCF(g) 100 в течение 30 с.

7.3.7 В случае использования стрипов:

7.3.7.1 Плотно закройте стрипы.

7.3.7.2 Центрифугируйте все стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с

7.3.8 Установите стрипы или микропланшет 96 лунок в блок детектирующего амплификатора.

7.3.9 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест[1]. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в Приложении Б.

7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А, ручное дозирование, Часть 2 из 3 и Часть 3 из 3

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.4.1 Промаркируйте необходимое количество одноразовых стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл или микропланшет 96 лунок для неизвестных образцов, отрицательного контрольного образца «К–» и положительных контрольных образцов «К+№1», «К+№2».

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 5 постановок при условии вариабельного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 2 положительных контрольных образцов в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 5 пробирок для неизвестных образцов; одну пробирку для отрицательного контрольного образца «К–» и две пробирки для положительных контрольных образцов «К+№1», «К+№2». Общее количество пробирок/лунок микропланшета – 8.

7.4.2 Тщательно перемешайте содержимое пробирок со смесью для амплификации Стрим, ПЦР-буфером Стрим-STK, положительным контрольным образцом №1 и положительным контрольным образцом №2 на микроцентрифуге-вортексе в

[1] – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов.

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

течение 3-5 с и центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.4.3 Центрифугируйте пробирки с минеральным маслом и полимеразой ТехноТаq MAX на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq MAX необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.4.4 Приготовьте смесь ПЦР-буфера Стрим-STK с полимеразой ТехноТаq MAX и смесью для амплификации Стрим. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

- 1,0×(N+1) мкл смеси для амплификации Стрим;
- 29×(N+1) мкл ПЦР–буфера Стрим-STK,
- 0,5×(N+1) мкл полимеразы ТехноТаq MAX,

где N — количество промаркированных пробирок/количество необходимых лунок микропланшета с учётом «К-», «К+№1» и «К+№2».

Пример:

Необходимо проанализировать 5 неизвестных образцов, «К-», «К+№1» и «К+№2». Промаркированных пробирок – 8. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера Стрим-STK с полимеразой ТехноТаq MAX и смесью для амплификации Стрим для 9 (8+1) пробирок/лунок микропланшета, т.е. 9,0 мкл смеси для амплификации Стрим, 261 мкл ПЦР-буфера Стрим-STK + 4,5 мкл полимеразы ТехноТаq MAX.

7.4.5 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера Стрим-STK с полимеразой ТехноТаq MAX и смесью для амплификации Стрим на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера Стрим-STK с полимеразой ТехноТаq MAX и смесью для амплификации Стрим необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.4.6 Внесите во все промаркированные пробирки/лунки микропланшета (включая «К», «К+№1» и «К+№2») по 30 мкл смеси ПЦР-буфера Стрим-STK с полимеразой ТехноТаq MAX и смесью для амплификации Стрим.

ВНИМАНИЕ! Не допускается хранение смеси ПЦР-буфера Стрим-STK с полимеразой ТехноТаq MAX и смеси для амплификации Стрим в стрипованных пробирках/ микропланшете, после дозирования смеси необходимо сразу выполнить пункты 7.4.7- 7.4.14.

7.4.7 Добавьте в пробирки/лунки со смесью по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте стрипы.

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

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Закрывайте стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.4.8 Внесите в соответствующие стрипованные пробирки/лунки по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки/лунки, промаркированные «К-», «К+№1» и «К+№2», ДНК не вносится.

7.4.9 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К-» 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

7.4.10 Внесите в пробирки/лунки, промаркированные «К+№1», «К+№2» по 5,0 мкл соответствующего положительного контрольного образца.

7.4.11 В случае использования микропланшетов 96 лунок:

7.4.11.1 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет 96 лунок в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак.

7.4.11.2 Проведите запечатывание микропланшета 96 лунок полимерной термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.4.11.3 Центрифугируйте микропланшет 96 лунок при RCF(g) 100 в течение 30 с.

7.4.12 В случае использования стрипов:

7.4.12.1 Плотно закройте стрипы.

7.4.12.2 Центрифугируйте все стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

7.4.13 Установите стрипы или микропланшет 96 лунок в блок детектирующего амплификатора.

7.4.14 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест[1]. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в Приложении Б.

[1] - тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов.

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

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится детектирующим амплификатором автоматически во время амплификации.

Детекция результатов осуществляется детектирующим амплификатором автоматически. Оформление протокола и анализ результатов проводятся в соответствии с инструкцией к прибору.

9 УЧЁТ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Учет результатов реакции осуществляется с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 Интерпретация результатов для каждого образца проводится с учётом значений Ср ДНК-мишеней TREC, SMN1 и KREC (каналы детекции Fam/Hex/Rox) и эндогенного внутреннего контроля (ВК) (канал детекции Cy5).

9.3 Критерии валидности положительного контрольного образца № 1:

Ср TREC (**Fam**)	Ср SMN1 (**Hex**)	Ср KREC (**Rox**)	Ср ВК (**Cy5**)
Указан	**Указан**	**Указан**	**Указан**
$\Delta Cp = \lvert Cp\ Fam - Cp\ Cy5 \rvert \leq 1$	-	$\Delta\ Cp = \lvert Cp\ Rox - Cp\ Cy5 \rvert \leq 1$	-

9.4 Критерий валидности положительного контрольного образца № 2:

Ср TREC (**Fam**)	Ср SMN1 (**Hex**)	Ср KREC (**Rox**)	Ср ВК (**Cy5**)
Не указан или ≥ 39	Не указан или ≥ 35	Не указан или ≥ 39	**Указан**

9.5 Критерий валидности отрицательного контрольного образца:

Ср TREC (**Fam**)	Ср SMN1 (**Hex**)	Ср KREC (**Rox**)	Ср ВК (**Cy5**)
Не указан или ≥ 39	Не указан или ≥ 38	Не указан или ≥ 39	Не указан или ≥ 37

ВНИМАНИЕ! При невыполнении любого из указанных условий валидности (см. 9.3 - 9.5) амплификации положительных контрольных образцов результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка ПЦР всей партии образцов.

9.6 Регистрация значения Ср по любому из каналов детекции для отрицательного контрольного образца может быть следствием контаминации (кросс-контаминации образцов при выполнении пробоподготовки, контаминации ПЦР-бокса образцами геномной ДНК и положительными контрольными образцами, а также контаминации лаборатории продуктами амплификации).

9.7 При регистрации значения Ср для отрицательного контрольного образца за пределами допустимых значений Ср (см. 9.5), а также регистрации Ср по каналу детекции Fam/Rox <39 для положительного контрольного образца №2 рекомендуется проведение

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

специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации. Результаты постановочной серии рекомендуется считать недостоверными, после устранения контаминации требуется повторное проведение исследования, начиная с этапа пробоподготовки биоматериала.

9.8 Для образцов, прошедших ПЦР со значением Ср ВК (канал детекции Cy5) ≤ 31, результат определяется как достоверный.

Содержание TREC и KREC оценивается по формулам 1 и 2 соответственно (см. 2.3), интерпретация выполняется в соответствии с таблицей 3 с учетом нижней границы биологического референтного интервала\ порогового значения нормы скрининга новорожденных для TREC и KREC (Приложение В).

Интерпретация результатов исследования на наличие гомозиготной делеции 7 экзона SMN1 выполняется в соответствии с таблицей 4.

9.9 В образцах со значением Ср ВК (канал детекции Cy5)> 31 результат определяется как недостоверный результат (нд). Недостоверный или сомнительный результат может быть обусловлен недостаточным количеством или качеством исходного биологического материала, нарушением протокола пробоподготовки или вызван присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др.

В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

ВНИМАНИЕ!

1. Результат интерпретации результатов исследования может быть сомнительным в случаях:

- переливания крови, проведения терапии, оказывающей влияние на лейкопоэз новорожденного (например, введение лекарственных ингибиторов лейкопоэза);
- приема препаратов или проведения иных видов терапии во время беременности, оказывающих влияние на формирование иммунной системы плода.

2. Результаты исследования могут быть интерпретированы только в комплексе с результатами других лабораторных и инструментальных исследований, клинической картиной, а также гестационным возрастом новорожденного.

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

Таблица 3 – Интерпретация результатов определения TREC и KREC

Значение показателя	TREC	KREC
В пределах биологического референтного интервала\выше порогового значения границы нормы (Приложение В)	Условная норма	Условная норма
Ниже биологического референтного интервала \порогового значения границы нормы (Приложение В)	Высокий риск первичных иммунодефицитных состояний, с нарушением Т-клеточного звена, и развития тяжелых инфекционных заболеваний (группа риска).	Высокий риск первичных иммунодефицитных состояний, с нарушением В-клеточного звена, и развития тяжелых инфекционных заболеваний (группа риска).
	Рекомендуется подтвердить результат повторным исследованием, начиная с этапа пробоподготовки	
Не определяется (0)	Максимальный риск иммунодефицита и развития тяжелых инфекционных заболеваний (ПИД).	Максимальный риск иммунодефицита и развития тяжелых инфекционных заболеваний (ПИД).
	Рекомендуется подтвердить результат повторным исследованием, начиная с этапа пробоподготовки	
Примечание - При регистрации Ср TREC/KREC ≥ 37 точность определения содержания TREC\KREC может быть снижена, в случае первичного результата – «Условная норма», повторное исследование данного образца СПК выполняется опционально.		

Таблица 4 – Интерпретация результатов исследования 7 экзона гена SMN1

Результат по каналу детекции		**Δ Ср = Ср (Hex) – Ср (Cy5)**	**Интерпретация**
Hex, Ср	**Cy5**, Ср		
Указан	**≤ 31**	**< 6,0 (включая отрицательные значения)**	Не обнаружена делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (N)
Указан	**≤ 31**	От 6,0 до 8,0	Сомнительный результат (?)[1]
Указан	**≤ 31**	**≥ 8,0**	**Обнаружена** делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (del)[2]
Не указан	**≤ 31**	Не учитывается	**Обнаружена** делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (del)[2]
Ср указан/не указан	Не указан	Не учитывается	Недостоверный результат (нд)
	> 31	Не учитывается	

[1] - при получении сомнительного результата требуется повторное исследование, начиная с этапа пробоподготовки. При воспроизведении сомнительного результата существует высокий риск диагноза СМА и рекомендуется исследование методом количественного MLPA-анализа или секвенирования;
[2] - рекомендуется подтвердить результат повторным исследованием, начиная с этапа пробоподготовки;
N – Не обнаружена делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (определено наличие 1 или более копий экзона 7 гена SMN1);
del – Обнаружена делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (определено 0 копий экзона 7 гена SMN1).

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

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнеров, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

10.1.2 Транспортировать в правильном положении в соответствии с манипуляционным знаком/надписью «ВЕРХ».

10.1.3 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТаq MAX, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.4 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТаq MAX в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С не более 5 суток.

10.1.5 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение и эксплуатация

10.2.1 Условия хранения и эксплуатации набора реагентов приведены в таблицах 5, 6.

Таблица 5 – Условия хранения и эксплуатации Фасовка S, стрипы, с пробоподготовкой

Наименование	Условия хранения до и после вскрытия упаковки
Часть 1 из 3	
Лизирующий раствор	от 2 °С до 25 °С
Сорбент	
Промывочный раствор № 1	
Промывочный раствор № 2	
Элюирующий раствор	
Планшет глубоколуночный 96 лунок для образцов СПК	
Планшет глубоколуночный 96 лунок для предобработанных образцов	
Планшет глубоколуночный 96 лунок	
Насадка на магнитные стержни 96	
Пленка для заклеивания планшета	
Часть 2 из 3	
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	от 2 °С до 8 °С
ПЦР-буфер	
Минеральное масло	
Положительный контрольный образец № 1	
Положительный контрольный образец № 2	
Крышки для стрипов	
Часть 3 из 3	
Полимераза ТехноТаq MAX	от минус18 °С до минус 22 °С

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

Таблица 6 – Условия хранения и эксплуатации Фасовка А, с пробоподготовкой

Наименование	Условия хранения до и после вскрытия упаковки
Часть 1 из 3	
Лизирующий раствор	от 2 °С до 25 °С
Сорбент	
Промывочный раствор № 1	
Промывочный раствор № 2	
Элюирующий раствор	
Планшет глубоколуночный 96 лунок для образцов СПК	
Планшет глубоколуночный 96 лунок для предобработанных образцов	
Планшет глубоколуночный 96 лунок	
Насадка на магнитные стержни 96	
Пленка для заклеивания планшета	
Часть 2 из 3	
Смесь для амплификации Стрим	от 2 °С до 8 °С
ПЦР-буфер Стрим-STK	
Минеральное масло	
Положительный контрольный образец № 1	
Положительный контрольный образец № 2	
Стрипы по 8 пробирок	
Крышки для стрипов	
Часть 3 из 3	
Полимераза ТехноТаq MAX	от минус 18 °С до минус 22 °С

10.2.2 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.2.3 Наборы реагентов следует хранить в холодильнике, холодильной или морозильной камере при температурах, указанных в таблицах 5, 6 в течение всего срока годности набора реагентов. Допускается компоненты набора реагентов Часть 1 из 3 хранить при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

10.2.4 Часть 1 из 3 хранить в правильном положении в соответствии с манипуляционным знаком/надписью «ВЕРХ») в защищенном от света месте. При хранении в холодильнике от 2 °С до 8 °С допускается выпадение небольшого осадка в лизирующем растворе и промывочном растворе № 1.

10.2.5 Смесь для амплификации Стрим и смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности.

Лизирующий раствор, промывочный раствор № 1, а также планшет глубоколуночный 96 лунок для образцов СПК, планшет глубоколуночный 96 лунок для предобработанных образцов, планшет глубоколуночный 96 лунок, насадку на магнитные стержни и пленку для заклеивания планшета следует хранить при температуре от 2 °С до 25 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности.

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

10.2.6 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.2.7 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

10.2.8 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

11.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для однократного применения и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Обратитесь к инструкции по применению
	Предел температуры	REF	Номер по каталогу
Σ	Содержимого достаточно для проведения n тестов		Изготовитель
	Использовать до		Не допускать воздействия солнечного света
LOT	Код партии (серии)	NON STERILE	Нестерильно
	Дата изготовления		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Запрет на повторное применение		

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

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ ISO 14971-2021 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям

ГОСТ 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения

ГОСТ Р 2.105-2019 Единая система конструкторской документации. Общие требования к текстовым документам

ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство. Медицинские изделия

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

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

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС» (ООО «ДНК-Технология ТС»), Россия.

Адрес производителя: 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4

Место производства:

ООО «ДНК-Технология ТС»: 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Научный сотрудник
ООО «НПФ ДНК-Технология» А.И. Никифорова
«12» октября 2023г.

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ «НМИЦ АГП
им. В.И. Кулакова» Минздрава России
академик РАН, профессор Г.Т. Сухих
«12» октября 2023 г.

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

Приложение А (справочное)

Порядок маркировки и расстановки глубоколуночных планшетов с образцами и реагентами в системе выделения Auto-Pure 96.

Этап предобработки:

Набор реагентов «НеоСкрин SMA/TREC/KREC» Часть1 из 3			**Auto-Pure 96**	
Маркировка, порядковый номер планшета	Содержимое планшета	Объём реагента в лунке	№ позиции планшета	Функция термостатирования
Без маркировки	Без реагента, с размещенной в нём насадкой на магнитные стержни	-	1	-
Вариант маркировки пользователя	Образцы СПК\ лизирующий раствор	300 мкл	2	да

Этап выделения ДНК:

Набор реагентов «НеоСкрин SMA/TREC/KREC» Часть1 из 3			**Auto-Pure 96**	
Маркировка, порядковый номер планшета	Содержимое планшета	Объём реагента в лунке	№ позиции планшета	Функция термостатирования
Без маркировки	Без реагента, с размещенной в нём насадкой на магнитные стержни	-	1	-
Планшет №1	Предобработанные образцы (после переноса)	300 мкл	2	да
Планшет №2	Сорбент	250 мкл	3	-
Планшет №3	Промывочный раствор №1	300 мкл	4	-
Планшет №4	Промывочный раствор №2	700 мкл	5	-
-	-	-	6	-
-	-	-	7	-
Планшет №5	Элюирующий раствор	70 мкл	8	да

ВНИМАНИЕ! При установке планшетов учитывается их ориентация: скошенные углы всех планшетов должны располагаться в левом нижнем углу держателя.

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

Приложение Б

Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» при использовании набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC

1) «Тип анализа» – выбрать «Мультиплекс»;

2) Указать количество контрольных образцов в тесте:

- Положительный (К+) – 2;
- Отрицательный (К –) – 1;

3) Указать объём реакционной смеси – 35 мкл;

4) Указать параметры анализа («Дополнительно»):

- Критерий положительного результата ПЦР: 80%;
- Критерий достоверности результатов:

  Нижняя граница/порог положительного результата: 10%
  Верхняя граница/порог положительного результата: 30%

5) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	2	00	1		Цикл
	94	5	00			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	10	…	…	Хранение		Хранение

√- режим оптических измерений

6) «Флуорофоры», внести следующие параметры:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Специфика	Специфика	Специфика	ВК	отсутствует

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

Приложение В

Биологический референтный интервал (новорождённые), для сухих пятен крови

Границы референтных интервалов:	TREC, копий на 10^5 лейкоцитов	KREC, копий на 10^5 лейкоцитов
Верхняя граница (95% референтный интервал)	2900	3200
Нижняя граница (95% референтный интервал)	460	270
Нижняя граница (99% «левосторонний» референтный интервал)	360	210
Нижняя граница (99,9% «левосторонний» референтный интервал)	210	140
Расширенный неонатальный скрининг:	Пороговое значение нормы устанавливается согласно рекомендациям РНС	
Примечание – Референтный интервал для концентраций TREC и KREC установлен по выборке 3576 сухих пятен крови новорожденных с применением набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC; для интерпретации результатов исследования допускается привлечение данных нормальных диапазонов TREC и KREC, **пороговых значений**, указанных в медицинских реферируемых изданиях и рекомендациях РНС.		

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