



661-1 2022-10-26



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора 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

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2022/17512 от 08 июня 2022 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ	7
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	8
2.1 Состав набора реагентов	8
2.2 Количество анализируемых образцов	9
2.3 Принцип метода.....	9
2.4 Время проведения анализа.....	11
3 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	12
3.1 Специфичность анализа	12
3.2 Интерферирующие вещества	13
3.3 Предел обнаружения.....	14
3.4 Диапазон измерения TREC и KREC.....	14
3.5 Характеристики точности.....	14
3.6 Диагностические характеристики.....	14
3.7 Воспроизводимость результатов.....	15
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	15
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	17
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	18
6.1 Материал для исследования	18
6.2 Взятие материала на исследование	18
6.3 Транспортирование и хранение исследуемых образцов	19
6.4 Подготовка сухих пятен крови к выделению ДНК	19
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	20
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	20
7.2 Подготовка и проведение ПЦР	21
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	22
9 УЧЁТ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ	23
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	26
10.1 Транспортирование	26
10.2 Хранение.....	26
10.3 Указания по эксплуатации	26
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	27
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	27
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ.....	27
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	27
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	28
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	29
Приложение А	30
Приложение В	31

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

СМА	- спинальная мышечная атрофия
KREC	- от англ. <i>kappa-deleting recombination excision circle</i> – рекомбинационное кольцо каппа-делеционного элемента
MLPA	- от <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i> - метод мультиплексной амплификации лигированных зондов
SMN1	- от англ. <i>survival of motor neuron</i> - «ген выживаемости моторных нейронов 1»
SMN2	- от англ. <i>survival of motor neuron</i> - «ген выживаемости моторных нейронов 2»
TREC	- от англ. <i>T cell receptor (TCR) excision circles</i> – эксцизионное кольцо Т-клеточного рецептора
ВК	- внутренний контроль
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИВ	- интерферирующие вещества
К-	- отрицательный контрольный образец
К+№1	- положительный контрольный образец К+№1
К+№2	- положительный контрольный образец К+№2
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
НК	- нуклеиновые кислоты
ПИД	- первичные иммунодефициты
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
СПК	- сухое пятно крови
ТКИН	- тяжёлая комбинированная иммунная недостаточность

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 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].

Гомозиготные делеции экзонов 7 или 7-8 представляют наиболее распространённый вариант мутаций гена SMN1 и выявляются у 95% пациентов СМА [8,9].

СМА входит в число частых наследственных заболеваний. Общепопуляционная распространенность проксимальной спинальной мышечной атрофии составляет 1 на 6000 – 10000 новорожденных [9,10].

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 [8-10]. 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.
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. 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.

1 ПРЕНАЗНАЧЕННОЕ 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. 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.

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 жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Полимераза ТехноТaq МАХ	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	50 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец К+№1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Положительный контрольный образец К+№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 жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок	по 20 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Полимераза ТехноТaq МАХ	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	50 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец К+№1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Положительный контрольный образец К+№2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

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

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов предназначен для однократного применения и рассчитан на 96 определений (включая отрицательные и положительные контрольные образцы).

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 достройкой 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 использованием Taq-полимеразы, блокированной антителами. Старт полимеразной цепной реакции происходит только при расплавлении парафина и 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 специфического 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, используемого для детекции продукта амплификации ДНК TREC, включена флуоресцентная метка Fam.

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

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

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Т а б л и ц а 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

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

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

Содержание TREC и KREC в исследуемом образце оценивается по формулам:

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

где $C_p \text{ BK}$ – значение индикаторного цикла (C_p) БК;

где $C_p \text{ TREC}$ – значение индикаторного цикла (C_p) TREC.

Если значение $C_p \text{ TREC}$ для образца не указано, содержание TREC составляет 0 копий на 10^5 лейкоцитов.

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

где $C_p \text{ BK}$ – значение индикаторного цикла (C_p) БК;

где $C_p \text{ KREC}$ – значение индикаторного цикла (C_p) KREC.

Если значение $C_p \text{ KREC}$ для образца не указано, содержание KREC составляет 0 копий на 10^5 лейкоцитов.

Анализ делеции 7 экзона SMN1 основан на оценке разницы индикаторного цикла (ΔC_p) между значениями $C_p \text{ SMN1}$ (канал Hex) и $C_p \text{ BK}$ (канал Cy5) (**$\Delta C_p = C_p \text{ (Hex)} - C_p \text{ (Cy5)}$**).

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 C_p по каналу БК ≤ 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 не включены в состав набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC.

Рекомендованными (валидированными) к совместному использованию с набором реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC 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.

2.4 Время проведения анализа (без учета пробоподготовки): от 1,5 часов.

3 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

3.1 Специфичность анализа

В образцах биологического материала, 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 Нех в случае гомозиготной делеции 7 экзона гена SMN1 при условии разницы между значениями Ср по каналу Нех и Ср по каналу Cy5 (ΔCp) ≥ 9 .

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 реагентов 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.

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 С_р 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 и холестерин. 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», остаточный гемоглобин.

При строгом соблюдении инструкции к рекомендованным наборам реагентов для выделения ДНК эффекта ингибирования промывочного раствора и гемоглобина не наблюдается.

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. Максимальная концентрация гемоглобина, при которой не наблюдалось ингибирования ПЦР, составляет не более 0,5 мг/мл в препарате ДНК.

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

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

Потенциальные интерферирующие вещества	Набор реагентов для выделения/Биоматериал	
	«ПРОБА-МЧ МАКС» / Цельная кровь	«ПРОБА-ЦИТО СП» / СПК
Экзогенные		
К2, К3 ЭДТА	3,60 мг/мл	3,60 мг/мл
Цитрат натрия	0,26 моль/л	0,26 моль/л
Эндогенные		
Гемоглобин	250 г/л	250 г/л
Билирубин	500 мкмоль/л	500 мкмоль/л
Холестерин	12 ммоль/л	12 ммоль/л

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

В случае подтверждения 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 $Cp\ Cq5 < 28$)
- 10^3 копий на 10^5 лейкоцитов (при $Cp\ Cq5\ 28 \leq Cp \leq 31$)

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 $Cp\ Cq5 < 28$)
- 10^3 – 10^5 копий на 10^5 лейкоцитов (при $Cp\ Cq5\ 28 \leq Cp \leq 31$)

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 $\leq 5\%$.

Предельная ошибка (аналитическая) определения содержания TREC и KREC составляет $\pm 0,1 \lg$ копий/ 10^5 лейкоцитов.

Предел точности определения содержания TREC и KREC составляет $\pm 0,3 \lg$ копий/ 10^5 лейкоцитов.

3.6 Диагностические характеристики

	TREC	KREC	Делеция 7 экзона SMN1 в ГОМОЗИГОТНОМ СОСТОЯНИИ
Количество образцов	61	61	61
Диагностическая чувствительность (ДИ95%)	100.00% (88.78%-100.00%)	93.33% (68.05%-99.83%)	3 из 3 100.00% (29.24%- 100.00%)
Диагностическая специфичность (ДИ95%)	100.00% (88.43%-100.00%)	97,83% (88.47%-99.95%)	100.00% (93.84%-100.00%)

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

При оценке 7 экзона гена SMN1 истинно положительным результатом считали **наличие** 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, трёх моделей 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.

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 санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследуемые 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 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 и проведение исследования биоматериала с использованием набора реагентов следует проводить в боксах биологической безопасности II класса

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 НК 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.

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».

Таблица 4 – Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасных компонентов	Указание на риски
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Нет опасных веществ	-
Полимераза ТехноТaq МАХ	Нет опасных веществ	-
ПЦР-буфер	Нет опасных веществ	-
Минеральное масло	Нет опасных веществ	-
Положительный контрольный образец К+N№1	Азид натрия менее 0,1%	является безопасным для конечного пользователя
Положительный контрольный образец К+N№2	Азид натрия менее 0,1%	является безопасным для конечного пользователя

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

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.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий («ДТпрайм», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229, «ДТлайт», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228; ДТ-96; ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2007/01250);
- микроцентрифуга-вортекс;
- ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл (только для фасовки S, стрипы);
- холодильник;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 0,5 – 10 мкл, 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200 – 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 10 мкл, 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- штатив для дозаторов;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

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 СП 1.3.2322-08.

6.2 Взятие материала на исследование

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 (Приложение № 2 к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 22 марта 2006 года, № 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные болезни») и инструкциями производителей к бумажным фильтровальным тест-бланкам, зарегистрированным в установленном порядке.

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).

Кровь наносится на бумажный носитель (тест-бланк) 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 не менее 2 часов без применения дополнительной тепловой обработки.

Для получения сухого пятна допускается использование образца цельной периферической крови, предварительно забранной в пробирку с антикоагулянтом.

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 объемом 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.

6.3 Транспортирование и хранение исследуемых образцов

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 к выделению ДНК

Для анализа образца сухого пятна крови из его центральной части с помощью перфоратора – пробойника или аналогичного оборудования следует выбить три диска диаметром 3,0 мм (допускается использовать диски диаметром 3,2 мм).

Примечание – Рекомендуется выбивать диски непосредственно перед выделением ДНК.

6.4.1 Промаркируйте необходимое количество одноразовых пластиковых пробирок объёмом 1,5 мл с учетом пробирки для отрицательного контрольного образца (К-).

6.4.2 С помощью перфоратора-пробойника выбейте из образцов сухих пятен крови по три диска и поместите в промаркированные пробирки. В пробирку отрицательного контрольного образца (К-) бумажные диски не вносятся.

Полученные образцы готовы к выделению ДНК.

ВНИМАНИЕ! Выбитые диски должны быть полностью пропитаны кровью. Рекомендуется выбивать диски, не захватывая область разметки, ограничивающей пятно крови.

Примечание – Перед выбиванием каждого нового образца сухого пятна рекомендуется сделать 2 – 3 высечки на чистом участке фильтровальной бумаги, что позволит снизить риск контаминации предыдущим образцом.

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
«ПРОБА-ЦИТО СП» (ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2021/14367)	сухие пятна крови
«ПРОБА-МЧ МАКС» (ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2021/14391)	цельная периферическая кровь

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки.

7.1.1 Цельная периферическая кровь.

Выделение ДНК из цельной крови выполняется с использованием набора реагентов «ПРОБА-МЧ МАКС» согласно инструкции производителя. 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 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 набора реагентов «ПРОБА-ЦИТО СП» согласно инструкции производителя.

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

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

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

ВНИМАНИЕ! При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы», 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 исследуемого образца, отрицательного контрольного образца (К-), положительного контрольного образца К+№1 и положительного контрольного образца К+№2.

Пример: Необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 5 пробирок для исследуемых образцов; одну пробирку 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 ТехноТaq МАХ в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

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

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

- $10 \times (N+1)$ мкл ПЦР-буфера;
- $0,5 \times (N+1)$ мкл полимеразы ТехноТaq МАХ,

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

7.2.4 Встряхните пробирку со смесью на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

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 ТехноТaq МАХ.

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

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

ВНИМАНИЕ! 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 препаратов ДНК. В пробирки «К-», «К+№1» и «К+№2» ДНК не вносится. Закройте пробирки/стрипы плотно.

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 в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.12 Установите все пробирки/стрипы в блок детектирующего амплификатора.

7.2.13 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите тест «NeoScreenSTK». Далее и при последующих постановках создайте протокол исследования «НеоСкрин SMA/TREC/KREC»: 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. В окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в Приложении Б.

Примечание – Тест (NeoScreenSTK) для приборов «ДТпрайм», «ДТлайт», «ДТ-96» можно создать путём ввода параметров в соответствии с приложением Б, или данный тест предоставляется производителем набора реагентов.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

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

9 УЧЁТ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

- 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** Для положительного контрольного образца №1 должны быть указаны значения Ср по каналам детекции Fam, Hex, Rox и Cy5; абсолютное значение $\Delta\text{Cp} = \text{Cp Fam} - \text{Cp Cy5}$ и $\Delta\text{Cp} = \text{Cp Rox} - \text{Cp Cy5}$ должно быть ≤ 1 .
- 9.4** Для положительного контрольного образца №2 должны быть указаны значения Ср по каналам детекции Hex и Cy5 и зафиксирован отрицательный результат амплификации по каналам детекции (не указаны значения Ср) Fam и Rox.
- 9.5** Для отрицательного контрольного образца должен быть зафиксирован отрицательный результат амплификации по каналам детекции Fam, Hex, Rox и Cy5. Допускается регистрация значений $\text{Cp} \geq 38$ по каналам детекции Hex и Cy5.

ВНИМАНИЕ! При невыполнении любого из указанных условий валидности (9.3, 9.4) амплификации контрольных образцов результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка ПЦР всей партии образцов.

Регистрация значения Ср по любому из каналов детекции для отрицательного контрольного образца может быть следствием контаминации (кросс-контаминации образцов ходе подготовки ПЦР, контаминации ПЦР-бокса образцами геномной ДНК или положительными контрольными образцами, также контаминации помещения лаборатории продуктами амплификации).

При регистрации значения Ср для отрицательного контрольного образца, а также регистрации Ср по каналу детекции Fam/Rox в положительном контрольном образце №2 рекомендуется проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

При регистрации Ср ВК (Cy5) и/или Ср SMN1 (Hex) < 38 для отрицательного контрольного образца результаты всей постановочной серии рекомендуется считать недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации, и повторное проведение исследования, начиная с этапа пробоподготовки биоматериала.

- 9.6** 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 таблицами 6.1 и 6.2 с учетом нижней границы биологического референтного интервала для TREC и KREC (см. Приложение А).

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

ВНИМАНИЕ! Если значение Ср TREC и/или KREC для образца не указано, содержание TREC и/или KREC в анализируемом образце составляет 0 копий на 10⁵ лейкоцитов.

ВНИМАНИЕ! При регистрации значения Ср TREC и/или KREC ≥ 37 результат не может рассматриваться как надежный, рекомендуется подтвердить результат повторным исследованием, начиная с этапа пробоподготовки.

9.7 В образцах со значением Ср ВК (канал детекции Cy5) > 31 результат определяется как недостоверный результат.

Недостоверный или сомнительный результат может быть 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! Результат исследования может быть сомнительным в случаях:

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

Таблица 5 – Интерпретация результатов исследования 7 экзона гена SMN1

Результат по каналу детекции Hex	Результат по каналу детекции Cy5	$\Delta \text{Cp} = \text{Cp}(\text{Hex}) - \text{Cp}(\text{Cy5})$	Интерпретация
Ср указан	$\text{Cp} \leq 31$	< 7,0 (включая отрицательные значения)	Не обнаружена делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (N)
Ср указан	$\text{Cp} \leq 31$	От 7,0 до 9,0	Сомнительный результат (?) ¹
Ср указан	$\text{Cp} \leq 31$	$\geq 9,0$	Обнаружена делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (del) ²
Ср не указан	$\text{Cp} \leq 31$	не учитывается	Обнаружена делеция 7 экзона гена SMN1 в гомозиготном состоянии (del) ²
Ср указан/не указан	Ср не указан	не учитывается	Недостоверный результат (нд)
	$\text{Cp} > 31$	не учитывается	

¹ - при получении сомнительного результата, требуется повторное исследование, начиная с этапа пробоподготовки. При повторном получении сомнительного результата требуется исследование образца цельной периферической крови. При воспроизведении сомнительного результата образца цельной периферической крови существует высокий риск диагноза SMA и рекомендуется исследование методом количественного MLPA-анализа.

² - рекомендуется подтвердить результат повторным исследованием, начиная с этапа пробоподготовки

Таблица 6.1 - Интерпретация результатов определения TREC и KREC

Ср Fam (TREC) Ср Rox (KREC) оцениваются независимо	Ср Су5 (BK)	Интерпретация \ Алгоритм анализа результатов
Ср < 37	Ср ≤ 31	Содержание эксцизионных колец TREC и KREC вычислить по формуле (1) и (2). Результат сравнить с референтным интервалом (см. Таблицу 6.2 и Приложение А). В случае высокого риска иммунодефицитных состояний рекомендуется подтвердить результат повторным исследованием, начиная с этапа пробоподготовки.
Ср ≥ 37	Ср ≤ 31	Содержание эксцизионных колец TREC и KREC вычислить по формуле (1) и (2). Результат сравнить с референтным интервалом (см. Таблицу 6.2 и Приложение А). Содержание ДНК TREC и/или KREC в амплификационной пробирке на уровне предела обнаружения, рекомендуется подтвердить результат повторным исследованием, начиная с этапа пробоподготовки.
Не указано	Ср ≤ 31	Содержание TREC и/или KREC в анализируемом образце составляет 0 копий на 10 ⁵ лейкоцитов. Максимальный риск иммунодефицитных состояний. Рекомендуется подтвердить результат повторным исследованием, начиная с этапа пробоподготовки.
Не учитывается	Ср > 31 или не указано	Недостаточное количество ДНК или ингибирование ПЦР (см. п.9.7)

Таблица 6.2 - Интерпретация результатов определения TREC и KREC (сравнение с референтными значениями)

Значение показателя	TREC	KREC
В пределах биологического референтного интервала (см. Приложение А)	Условная норма	Условная норма
Ниже биологического референтного интервала (см. Приложение А)	Высокий риск первичных иммунодефицитных состояний, с нарушением Т-клеточного звена, и развития тяжелых инфекционных заболеваний.	Высокий риск первичных иммунодефицитных состояний, с нарушением В-клеточного звена, и развития тяжелых инфекционных заболеваний.
Не определяется (0)	Максимальный риск иммунодефицита и развития тяжелых инфекционных заболеваний.	Максимальный риск иммунодефицита и развития тяжелых инфекционных заболеваний.

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

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 контейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

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

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

10.2 Хранение

10.2.1 Пробирки/стрипы со смесью для амплификации, запечатанной парафином, ПЦР-буфер, минеральное масло и положительные контрольные образцы следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Пробирки/стрипы со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить в защищенном от света месте.

10.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

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

10.3 Указания по эксплуатации

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

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

10.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

- пробирки/стрипы со смесью для амплификации, запечатанной парафином, ПЦР-буфер, минеральное масло и положительные контрольные образцы

следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности реагентов. Пробирки/стрипы со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить в защищенном от света месте;

- полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

10.3.4 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, 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

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Обратитесь к инструкции по применению
	Предел температуры		Номер по каталогу
	Содержимого достаточно для проведения <i>n</i> тестов		Изготовитель
	Годен до		Не допускается воздействие солнечного света
	Номер серии		Нестерильно
	Дата изготовления		

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-2019 Единая система конструкторской документации (ЕСКД). Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

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

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

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

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований, Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

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 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

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

Примечание – Указанные выше стандарты являлись действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документа, 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.

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 EN 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»: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов НеоСкрин SMA/TREC/KREC, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:

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

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

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Биологический референтный интервал (новорождённые в возрасте до 7 дней)

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
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, указанных в медицинских реферируемых изданиях и клинических рекомендациях [Гордукова М.А., Корсунский И.А., Чурсинова Ю.В., Бяхова М.М., Оскорбин И.П., Продеус А.П., Филипенко М.Л. Определение референтных интервалов TREC и KREC для скрининга новорожденных с иммунодефицитными состояниями в РФ // Медицинская иммунология. 2019. №3.]		

Настройки теста «NeoScreenSTK» для программного обеспечения детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт», «ДТ-96» – RealTime_PCR

- 1) Тип анализа: Мультиплекс;
- 2) Количество контрольных образцов в тесте:
 - Положительный (К+) – 2;
 - Отрицательный (К-) – 1;
- 3) Объем реакционной смеси – 35 мкл;
- 4) Параметры анализа:
 - Критерий положительного результата ПЦР: 80%;
 - Величина Threshold StD на участке линейного фитирования: 10;
 - Критерий достоверности результатов:
 - Нижняя граница/порог положительного результата: 10%
 - Верхняя граница/порог положительного результата: 30%

4) Программа амплификации:

№ блока	Температура, °C	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						

5) Флуорофоры (Активные каналы детекции):

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

ДНК-Технология

117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное,
ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12

Тел./факс +7 (495) 640-17-71

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