



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для неинвазивного пренатального ДНК-скрининга анеуплоидий плода по крови матери
методом высокопроизводительного секвенирования NGS на платформе Illumina

АнеуСкрин ИЛМ

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2022/16394 от 24 января 2022 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1	ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ.....	4
2	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	5
2.1	Состав набора реагентов.....	5
2.2	Количество анализируемых образцов.....	21
2.3	Принцип метода	21
2.4	Время проведения анализа	23
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	24
3.1	Предел обнаружения	24
3.2	Специфичность	24
3.3	Интерферирующие вещества	24
3.4	Диагностические характеристики.....	25
3.5	Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость.....	25
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	26
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	28
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	29
6.1	Материал для исследования	29
6.2	Взятие материала на исследование.....	29
6.3	Транспортирование и хранение исследуемых образцов.....	29
6.4	Получение плазмы крови	29
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	31
7.1	Выделение внеклеточной ДНК из биологического материала.....	31
7.2	Подготовка библиотек фрагментов ДНК.....	31
8	ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВА И КАЧЕСТВА БИБЛИОТЕКИ.....	41
9	ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....	42
10	АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ.....	42
11	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	43
12	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	45
13	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	45
14	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	45
15	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	45
16	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	46
17	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	47
	ПРИЛОЖЕНИЕ 1	48
	ПРИЛОЖЕНИЕ 2	51
	ПРИЛОЖЕНИЕ 3	52
	ПРИЛОЖЕНИЕ 4	56

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

НИПС	- неинвазивный пренатальный скрининг
NGS	- Next Generation Sequencing
ПО	- программное обеспечение
ЛИС	- лабораторная информационная система
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
К-	- отрицательный контрольный образец
ДИ	- доверительный интервал
SNP	- single nucleotide polymorphism
вкДНК	- внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для неинвазивного пренатального ДНК-скрининга анеуплоидий плода по крови матери методом высокопроизводительного секвенирования NGS на платформе Illumina (АнеуСкрин ИЛМ), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для неинвазивного ДНК-скрининга беременных женщин с целью обнаружения хромосомных аномалий плода – анеуплоидий по аутосомам 13, 18, 21, половым хромосомам X и Y, а также частичных дупликаций и делеций с помощью исследования внеклеточной ДНК плода методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) на платформе Illumina с использованием программного обеспечения «АнеуСкрин». В качестве биологического материала используют периферическую кровь беременной женщины.

1.3 Функциональное назначение: скрининг беременных женщин.

1.4 Показания к проведению исследования: оценка риска наличия анеуплоидий и хромосомных аномалий у плода.
Противопоказаний к применению нет.

1.5 Демографические и популяционные аспекты: набор реагентов предназначен для скрининга беременных женщин с 10 недели¹ беременности.

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

1.7 Факторы, влияющие на результаты: материнский и плацентарный мозаицизм; недавнее переливание крови у матери; операция по трансплантации у матери; недавние хирургические вмешательства у матери; иммунотерапия и терапия стволовыми клетками у матери; злокачественные новообразования у матери; исчезающий близнец.
Многоплодная беременность не является фактором, влияющим на результат исследования с использованием набора реагентов.

1.8 Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.

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

¹ – имеется в виду акушерский срок

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

Набор реагентов выпускается в следующих вариантах комплектации:

Комплектация В.1 REF S5-H505-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 6
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 1	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 6
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Комплект реагентов для секвенирования				
Буфер НТ1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	12,0 мл	3 из 6
Картридж с реагентами	Резервуар, заполненный реактивами	1 шт.	–	4 из 6
Проточная ячейка	Ёмкость с проточной ячейкой в буферном растворе	1 шт.	–	5 из 6
Картридж с буфером	Резервуар, заполненный буфером	1 шт.	–	6 из 6
3. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация В.2 REF S5-H506-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 6
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 2	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 6
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Комплект реагентов для секвенирования				
Буфер HT1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	12,0 мл	3 из 6
Картридж с реагентами	Резервуар, заполненный реактивами	1 шт.	–	4 из 6
Проточная ячейка	Ёмкость с проточной ячейкой в буферном растворе	1 шт.	–	5 из 6
Картридж с буфером	Резервуар, заполненный буфером	1 шт.	–	6 из 6
3. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация В.3 REF S5-H507-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 6
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 3	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 6
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Комплект реагентов для секвенирования				
Буфер HT1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	12,0 мл	3 из 6
Картридж с реагентами	Резервуар, заполненный реактивами	1 шт.	–	4 из 6
Проточная ячейка	Ёмкость с проточной ячейкой в буферном растворе	1 шт.	–	5 из 6
Картридж с буфером	Резервуар, заполненный буфером	1 шт.	–	6 из 6
3. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация В.4 REF S5-H508-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 6
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 4	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 6
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Комплект реагентов для секвенирования				
Буфер HT1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	12,0 мл	3 из 6
Картридж с реагентами	Резервуар, заполненный реактивами	1 шт.	–	4 из 6
Проточная ячейка	Ёмкость с проточной ячейкой в буферном растворе	1 шт.	–	5 из 6
Картридж с буфером	Резервуар, заполненный буфером	1 шт.	–	6 из 6
3. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация В.5 REF S5-H509-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 6
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 5	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 6
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Комплект реагентов для секвенирования				
Буфер HT1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	12,0 мл	3 из 6
Картридж с реагентами	Резервуар, заполненный реактивами	1 шт.	–	4 из 6
Проточная ячейка	Ёмкость с проточной ячейкой в буферном растворе	1 шт.	–	5 из 6
Картридж с буфером	Резервуар, заполненный буфером	1 шт.	–	6 из 6
3. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация В.6 REF S5-H510-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 6
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 6	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 6
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Комплект реагентов для секвенирования				
Буфер HT1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	12,0 мл	3 из 6
Картридж с реагентами	Резервуар, заполненный реактивами	1 шт.	–	4 из 6
Проточная ячейка	Ёмкость с проточной ячейкой в буферном растворе	1 шт.	–	5 из 6
Картридж с буфером	Резервуар, заполненный буфером	1 шт.	–	6 из 6
3. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация В.7 REF S5-H511-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 6
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 7	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 6
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Комплект реагентов для секвенирования				
Буфер HT1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	12,0 мл	3 из 6
Картридж с реагентами	Резервуар, заполненный реактивами	1 шт.	–	4 из 6
Проточная ячейка	Ёмкость с проточной ячейкой в буферном растворе	1 шт.	–	5 из 6
Картридж с буфером	Резервуар, заполненный буфером	1 шт.	–	6 из 6
3. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация В.8 REF S5-H512-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 6
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 8	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 6
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Комплект реагентов для секвенирования				
Буфер HT1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	12,0 мл	3 из 6
Картридж с реагентами	Резервуар, заполненный реактивами	1 шт.	–	4 из 6
Проточная ячейка	Ёмкость с проточной ячейкой в буферном растворе	1 шт.	–	5 из 6
Картридж с буфером	Резервуар, заполненный буфером	1 шт.	–	6 из 6
3. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация А.1 REF S6-H505-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 2
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 1	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 2
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация А.2 REF S6-H506-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 2
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 2	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 2
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация А.3 REF S6-H507-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 2
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 3	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 2
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация А.4 REF S6-H508-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 2
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 4	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 2
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация А.5 REF S6-H509-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 2
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 5	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 2
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация А.6 REF S6-H510-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 2
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 6	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 2
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация А.7 REF S6-H511-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 2
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 7	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 2
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектация А.8 REF S6-H512-NI				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Коробка
1. Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК				
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл	1 из 2
Реагент K1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл	
Реагент K2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	16 мкл	
Реагент K3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл	
Фермент-KFR	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Фермент-PNK	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Реагент L3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл	
Фермент-KFEx-	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	220 мкл	
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	50 мкл	
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл	
Фермент-POL	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	25 мкл	
Индексы set 8	Высушенные смеси в виде осадка от бесцветного до синего цвета	6 стрипов по 8 пробирок		2 из 2
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1 флакон	11,1 мл	
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 4,5 мл	
2. Дистрибутив с программным обеспечением «АнеуСкрин» (версия 1.8 и выше)				

Комплектации отличаются между собой индексами, включенными в состав комплекта реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК (информация об индексах представлена в приложении 1).

Комплект поставки включает:

- Набор реагентов в одном из вариантов комплектации – 1 шт.;
- Инструкция по применению – 1 экз.;
- Паспорт – 1 экз.;
- Программное обеспечение – 1 шт.;
- Руководство пользователя – 1 шт.

Дистрибутив с программным обеспечением и Руководство пользователя поставляется на электронном носителе (USB-флеш-накопитель) при первой поставке набора реагентов и/или по сети Интернет.

ВНИМАНИЕ! Программное обеспечение предназначено только для совместного применения с набором реагентов АнеуСкрин ИЛМ.

Инструкция по применению набора реагентов и паспорт может предоставляться заказчику на бумажном/электронном носителе или на указанном сайте изготовителя.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов предназначен для однократного применения и рассчитан на 48 образцов (до 48 на 1 запуск секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx).

2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР), ферментативные реакции фосфорилирования и лигирования, качественный анализ.

Принцип метода основан на амплификации ДНК методом ПЦР, ферментативной реакции фосфорилирования 5' концов ДНК и лигирования дуплексов комплементарных олигонуклеотидов, несущих биоинформатическую метку, с полученными ампликонами.

Исследование с применением набора реагентов АнеуСкрин ИЛМ состоит из следующих этапов:

1. Выделение ДНК.

2. Подготовка библиотек фрагментов ДНК:

2.1 Ферментативная обработка и фосфорилирование концов.

Для фосфорилирования 5' концов ДНК используется способность фермента полинуклеотидкиназа специфически катализировать перенос остатка фосфорной кислоты от молекулы АТФ к 5'-гидроксигруппе 5'-концевого фрагмента ДНК.

2.2 Присоединение индексов с помощью реакции лигирования.

Для маркировки библиотек фрагментов ДНК используются индексы (дуплексы комплементарных олигонуклеотидов), которые имеют уникальную последовательность, позволяющую в дальнейшем программному обеспечению идентифицировать образцы. Маркировка библиотек фрагментов ДНК индексами, происходит с помощью реакции лигирования. Фермент ДНК-лигаза катализирует образование фосфодиэфирных связей между 3'-гидроксилем и 5'-фосфатом расположенных рядом оснований в ДНК, за счет чего способна «сшивать» двухцепочечные фрагменты ДНК.

2.3 Дополнительная амплификация, необходимая для наработки библиотек с двумя индексами.

3. Проведение высокопроизводительного секвенирования.

4. Анализ результатов с помощью программного обеспечения АнеуСкрин.

4.1 Начальные этапы обработки данных – процедуры демультиплексирования и генерации FASTQ файлов данных – выполняются на оборудовании производителя (секвенаторе). В результате работы секвенатора получаются FASTQ файлы с данными, соответствующими анализируемым образцам. Формат данных FASTQ представляет собой текстовый формат для хранения биологической последовательности (нуклеотидной последовательности, последовательности нуклеотидных оснований) и его соответствующие показатели качества.

4.2 Программное обеспечение АнеуСкрин проводит анализ FASTQ файлов, полученных с секвенатора. Процедура анализа включает:

- *Определение последовательности ДНК и выравнивание на геном человека.* Осуществляется выравнивание ридов (прочтений фрагментов ДНК) на референсную последовательность генома человека (версия GRCh37/hg19). Данные о выравнивании представляются в виде файлов формата BAM (<https://samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf>) и используются для дальнейшей обработки.
- *Фильтрация ПЦР-дубликатов.* Выполняется удаление данных о дубликатах последовательностей ДНК, образовавшихся при подготовке библиотек в результате использования полимеразной цепной реакции (ПЦР), которые не несут дополнительной информации, но добавляют лишний шум в данные для анализа. С этой целью используется процедура, выполняющая поиск и удаление совпадающих последовательностей в файлах данных.
- *Подсчет количества ридов на участках фиксированной длины и фильтрация ридов по качеству выравнивания.* Выполняется фильтрация ридов по качеству выравнивания. Для этого используется параметр MAPQ (<http://samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf>), характеризующий вероятность того, что местоположение последовательности рида определено правильно. В системе используется значение MAPQ>10.
- *Фильтрация неуникальных участков генома.* В геноме человека значительная часть последовательности (около 15%) не является уникальной, в связи с чем, определить расположение фрагментов, относящихся к таким последовательностям, не представляется возможным. Для определения неуникальных участков на основании последовательности референсного генома (версия GRCh37/hg19) был сформирован искусственный набор выровненных фрагментов ДНК длиной 160 п.н. На данном этапе обработки, полученные неуникальные фрагменты исключаются из анализа данных образцов.
- *GC-коррекция.* Процесс пробоподготовки и секвенирования в значительной степени зависит от GC состава фрагментов ДНК. Из-за этого может происходить изменение в представленности фрагментов в зависимости от их GC состава. Для того, чтобы исправить изменения, вносимые в итоговое покрытие хромосом, на данном этапе обработки применяется GC-коррекция, которая проводится методом локальной линейной регрессии с использованием весовой функции (LOESS) (Fan H.C. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. / H.C. Fan, Y.J. Blumenfeld, U. Chitkara, L. Hudgins, S.R. Quake // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2008)
- *Подсчет значения Z.* Выполняется расчет стандартизованной оценки (z-оценка, англ.: Standard score, z-score, https://en.wikipedia.org/wiki/Standard_score) – меры относительного разброса измеренных значений покрытия исследуемой

хромосомы, сравнения с остальными хромосомами внутри образца и проверка статистической значимости обнаруженных отличий с предварительной нормировкой на референсный набор образцов и без неё.

- *Подсчет значения T.* Для обнаружения различия между средними выборок данных покрытия, полученных на предыдущем этапе, рассчитывается значение T-распределения (ГОСТ Р 50779.10-2000 (ИСО 3534.1-93)) Статистические методы. Вероятность и основы статистики. Термины и определения (<https://opentextbc.ca/introductorybusinessstatistics/chapter/the-t-test-2/>).
- *Проверка соответствия результатов T и Z.* Выполняется проверка результатов, полученных на предыдущих этапах. При совпадении результатов по 13, 18, 21, X и Y хромосомам выдается результат. При наличии несовпадений результат не валиден.
- *Контроль качества.* Анализируется применимость результата проведенных расчетов, в качестве порогового значения принимается доля ДНК плода больше 4%. Помимо доли ДНК плода анализируется зависимость покрытия фрагментов по GC состава, распределение ридов по длине, стандартное отклонение покрытия фрагментов генома. При необходимости возможен анализ результатов с фильтрацией фрагментов по длине, что позволяет повысить точность результатов.
- *Формирование результата.* В случае если значения Z и T превышают критические, выдается риск наличия трисомии по соответствующей хромосоме, если все значения в пределах нормы – риск низкий. В итоге на основе проведенного анализа выносится заключение касательно высокого/низкого риска наличия анеуплоидий у плода.

ВНИМАНИЕ! Клинико-диагностическая лаборатория должна провести валидацию медицинского изделия АнеуСкрин ИЛМ перед началом процесса (при первичной подготовке библиотек) с использованием референтных образцов.

Для валидации медицинского изделия в качестве положительных и отрицательных контролей возможно использование образцов плазмы крови беременных женщин, забранных на сроке гестации больше 10 недель с известным кариотипом плода.

2.4 Время проведения анализа (без учета пробоподготовки и проведения секвенирования) – от 8 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Предел обнаружения

Концентрация внеклеточной ДНК составляет 0,1 нг/мкл, что соответствует 4,0 нг внеклеточной ДНК человека на библиотеку. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу набора реагентов. Фракция фетальной внеклеточной ДНК должна составлять не менее 4% (минимально необходимая фракция фетальной внеклеточной ДНК для двухплодной беременности 8%, а для трехплодной беременности 12%). В случае если фракция фетальной внеклеточной ДНК составляет менее 4%, возможно получение ложноположительных/ложноотрицательных результатов.

3.2 Специфичность

На этапе оценки готовой библиотеки из внеклеточной ДНК на капиллярном электрофорезе должен определяться пик длиной от 270 до 340 п.н.

После проведения секвенирования ПО «АнеуСкрин» должно определить долю ДНК плода и риск наличия анеуплоидий по 13, 18, 21, X и Y хромосомам (низкий/высокий). При наличии высокого риска трисомии по другим хромосомам это так же будет отмечено в заключении по результатам исследования.

Информация о наличии или отсутствии риска анеуплоидий по 13, 18, 21, X и Y хромосомам выдается ПО автоматически. Для получения информации о наличии частичных дупликаций и делеций требуется участие биоинформатика.

3.3 Интерферирующие вещества

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось ингибирование ПЦР, представлены в таблице ниже.

Вид биоматериала	Интерферирующее вещество	Исследованная концентрация в образце
Эндогенные вещества		
Кровь	Билирубин	684 мкмоль/л
Кровь	Холестерин	13 ммоль/л
Кровь	Триглицериды	37 ммоль/л
Экзогенные вещества		
Кровь	ЭДТА	до 2,0 мг/мл ²
Кровь	Изопропиловый спирт	10%
Кровь	Метилацетат	10%

² – согласно ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калия ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл

3.4 Диагностические характеристики

При исследовании 137 образцов периферической крови беременных женщин (количество исследованных кариотипов плодов – 138) было выявлено 26 образцов с анеуплоидиями по 13,18,21 хромосомам, 7 образцов с анеуплоидиями по половым хромосомам, а также 3 образца с частичными дупликациями и делециями.

Диагностическая чувствительность и специфичность набора реагентов представлена в таблице ниже.

Кариотип	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Анеуплоидии по аутосомам 13, 18, 21	100% (88,67 – 100)	100% (96,76 – 100)
Анеуплоидии по половым хромосомам X и Y	100% (59,04 – 100)	100% (97,22 – 100)
Частичные дупликации и делеции	100% (29,24 – 100)	100% (97,30 – 100)
Все хромосомные аномалии	100% (90,26 – 100)	100% (96,45 – 100)

В ходе клинических испытаний был исследован один образец периферической крови беременной женщины с многоплодной беременностью (двойня), в котором набором реагентов было установлен высокий риск анеуплоидии по 21 хромосоме для одного из плодов и низкий риск развития анеуплоидий и хромосомных аномалий для другого плода, данные результаты соответствовали данным исследования с использованием кариотипирования.

3.5 Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость

Оценка внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости набора реагентов была установлена на 48 образцах.

Внутрисерийная воспроизводимость составляет 100% (95% доверительный интервал 92,6–100%).

Межсерийная воспроизводимость составляет 100% (95% доверительный интервал 92,6–100%).

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 СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

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 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

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

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

При использовании набора реагентов для предотвращения контаминации этапы выделения ДНК, ПЦР, детекции результатов амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических дозаторов, халатами и прочими принадлежностями.

При проведении электрофореза запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания.

При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской. Выделение вкДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Приготовление реакционной смеси необходимо 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.

Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

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

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации за исключением этапов проведения детекции методом гель-электрофореза и подготовки библиотек, которые проводят в зоне 4 (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 2.1.3684-2021 «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».

В соответствии с информацией производителя покупного изделия комплект реагентов для секвенирования NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 cycles), Illumina, США, а именно, картридж с реагентами (ячейка 6) содержит формамид, который является репродуктивным токсином (Н360³). Может наносить вред при вдыхании, заглатывании, попадании на кожу или в глаза. Меры предосторожности: P201, P314⁴.

При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При контакте с реагентом незамедлительно снять пропитанную им одежду, обильно промыть пораженный участок под проточной прохладной водой и при необходимости обратиться за медицинской помощью.

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

Не допускается 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.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалы 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.

³ – Н360 – может нарушать способность к размножению или причинять вред нерождённому ребёнку. Может наносить вред при вдыхании.

⁴ – P201 – перед использованием пройти инструктаж по работе с данной продукцией. P314 – в случае плохого самочувствия обратиться к врачу.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор с нагреваемой крышкой (например, ДТлайт, РУ № ФСР 2011/10228; ДТпрайм, РУ № ФСР 2011/10229 или ДТ-96, РУ № ФСР 2007/01250, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS) (Illumina, США) РУ № РЗН 2021/13216;
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости 0,5–10 мкл, 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл (например, Eppendorf Research® Plus, Эппендорф АГ, Германия, РУ № ФСЗ 2011/11028);

Дополнительное общелабораторное оборудование:

- бокс биологической безопасности II класса;
- ПЦР-бокс;
- центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF не более 12000 x g;
- флуориметр или флуоресцентный анализатор;
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник с морозильной камерой;
- магнитный штатив;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,5, 1,5 мл и 2,0 мл;
- штатив для дозаторов;
- источник питания (например, Эльф-4, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- камера для горизонтального агарозного электрофореза.

Дополнительные расходные материалы:

- вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette с ЭДТА;
- одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз, вместимостью 10 мкл, 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз;
- одноразовые пробирки объёмом 0,2 мл, 0,5 мл, 2,0 мл, свободные от РНКаз и ДНКаз;
- пробирки амплификационные объёмом 0,2 мл в стрипах по 8 шт, свободные от РНКаз и ДНКаз;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- дезинфицирующее средство;
- маркер длин амплифицированных фрагментов (например, pUC19 ДНК/MspI ООО «Силекс», Россия).

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь беременной женщины.

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

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту/набору реагентов для выделения ДНК из биологического материала.

6.2 Взятие материала на исследование

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объёмом 9,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл.

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

Транспортировать и хранить образцы в вакуумных пластиковых пробирках типа Vacuette до начала исследования следует при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 ч. В случае невозможности доставки в лабораторию и обработки материала в течение 3 ч необходимо взятие крови в специальные пробирки со стабилизатором внеклеточной ДНК.

ВНИМАНИЕ! Замораживание не допускается.

6.4 Получение плазмы крови

6.4.1 Центрифугируйте пробирки с кровью при 1600 x g в течение 20 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

ВНИМАНИЕ! Относительное ускорение центрифуги (RCF или g) зависит от частоты вращения и радиуса центрифугирования (Приложение 4). Для определения соответствия центрифуги заданным параметрам центрифугирования (см. раздел 5 «Оборудование и материалы») обратитесь к руководству по эксплуатации.

6.4.2 Промаркируйте необходимое количество пробирок объёмом 2,0 мл (не менее двух для каждого исследуемого образца плазмы).

6.4.3 Отберите автоматическим дозатором верхнюю фракцию (плазма), не задевая осажденную (клеточную) фракцию, и перенесите в промаркированные пробирки.

6.4.4 Центрифугируйте пробирки с плазмой при 12000 x g в течение 15 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

6.4.5 Промаркируйте необходимое количество пробирок объёмом 2,0 мл (не менее двух для каждого исследуемого образца плазмы).

6.4.6 Отберите автоматическим дозатором верхнюю фракцию (плазма), не задевая осажденную (клеточную) фракцию, и перенесите во все промаркированные пробирки.

ВНИМАНИЕ! Осадок не переносить и не повреждать.

ВНИМАНИЕ! Для выделения вкДНК используется только 2,0 мл плазмы! Оставшаяся плазма может быть заморожена при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С и, при необходимости, использована для повторного выделения ДНК.

До начала выделения пробирки с плазмой могут храниться при температуре от 4 °С до 8 °С в течение 8 часов.

При планировании выделения внеклеточной ДНК на следующий день или позже, пробирки с плазмой необходимо заморозить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С. Замороженная плазма может храниться не более 3 месяцев. Перед началом выделения по одной пробирке каждого образца необходимо разморозить при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение внеклеточной ДНК из биологического материала

Для выделения внеклеточной ДНК из периферической крови беременной женщины допускается использование любых наборов/комплектов реагентов, зарегистрированных в качестве медицинского изделия и рекомендованных производителями для выделения внеклеточной ДНК из соответствующего вида биоматериала.

ВНИМАНИЕ! Объем плазмы для выделения вкДНК составляет 2,0 мл. При выделении вкДНК из биологического материала одновременно необходимо подготовить отрицательный контрольный образец. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать стерильный физиологический раствор в объеме 2,0 мл.

7.2 Подготовка библиотек фрагментов ДНК

7.2.1 Подготовка фрагментов ДНК к лигированию и их очистка

7.2.1.1 По окончании выделения проведите оценку концентрации выделенной вкДНК на флуориметре или флуоресцентном анализаторе согласно инструкции к набору реагентов и прибору.

7.2.1.2 Промаркируйте по одной одноразовой пустой пробирке объемом 0,2 мл для каждого исследуемого образца.

7.2.1.3 Рассчитайте необходимый объем вносимой ДНК

$$A=4/B,$$

где: А – необходимый объем вносимой ДНК

В – концентрация вкДНК, измеренная на флуориметре или флуоресцентном анализаторе.

7.2.1.4 Внесите в соответствующие пробирки необходимый объем выделенной ДНК (по 4,0 нг, см. 7.2.1.3). Доведите объем раствора до 37 мкл буфером для разведения ДНК.

7.2.1.5 Инкубируйте пробирки с реагентом К1, реагентом К2 и реагентом К3 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирки в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.1.6 Встряхните пробирки с ферментом-KFR и ферментом-PNK в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Фермент-KFR и фермент-PNK следует извлекать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.2.1.7 Смешайте в отдельной пробирке объемом 1,5 мл:
- 5,0 x (N+1) мкл реагента K1,
 - 0,3 x (N+1) мкл реагента K2,
 - 6,0 x (N+1) мкл реагента K3,
 - 1,0 x (N+1) мкл фермента-KFR,
 - 1,0 x (N+1) мкл фермента-PNK,
- где N – количество исследуемых образцов.
- 7.2.1.8 Закройте крышку пробирки, встряхните пробирки в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.1.9 Осторожно добавьте в каждую промаркированную пробирку (отдельным наконечником для каждой пробирки) по 13 мкл приготовленной смеси, закройте крышки пробирок, встряхните пробирки в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.1.10 Установите пробирки в блок амплификатора и проведите реакцию с учетом объема реакционной смеси, равного 50 мкл, по программе, приведенной в таблице 2.

Таблица 2 – Программа амплификации

№ блока	Температура, °C	Время		Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
		мин	с			
1	37,0	30	00	1		Цикл
2	4,0	...	...	Хранение		Хранение

- 7.2.1.11 После окончания термостатирования извлеките пробирки из амплификатора и поместите их на рабочий стол.
- 7.2.1.12 Встряхните флакон с раствором МЧ в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе до получения раствора равномерного коричневого цвета. Инкубируйте не менее 30 минут при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
- 7.2.1.13 Встряхните флакон с раствором МЧ в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе до получения раствора равномерного коричневого цвета перед использованием.
- 7.2.1.14 Промаркируйте по одной одноразовой пустой пробирке объемом 1,5 мл для каждого исследуемого образца.
- 7.2.1.15 Внесите в промаркированные пробирки объемом 1,5 мл по 120 мкл раствора МЧ и добавьте весь объем из соответствующей пробирки объемом 0,2 мл. Закройте крышки пробирок. Встряхните пробирки в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

- 7.2.1.16 Инкубируйте пробирки в течение 5 минут при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
- 7.2.1.17 Приготовьте 75% этанол. Для этого смешайте в отдельном флаконе:
- 1,0 x (N+1) мл 96% этанола
 - 265 x (N+1) мкл деионизированной воды.
- где N – количество исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! Срок хранения 75% этанола не более 3-х дней. По истечении этого срока, следует приготовить новый раствор.

- 7.2.1.18 Поместите пробирки в магнитный штатив.
- 7.2.1.19 Инкубируйте пробирки в течение 3 минут при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенки пробирки.
- 7.2.1.20 Удалите надосадочную жидкость дозатором, не задевая магнитные частицы.
- 7.2.1.21 Добавьте в каждую пробирку 300 мкл 75% этанола.
- 7.2.1.22 Извлеките пробирки из магнитного штатива и поместите обратно, провернув каждую пробирку на 180 градусов. Повторите 4–5 раз.
- 7.2.1.23 Удалите надосадочную жидкость дозатором, не задевая магнитные частицы.
- 7.2.1.24 Повторите 7.2.1.21–7.2.1.23.
- 7.2.1.25 Закройте крышки пробирок. Центрифугируйте пробирки в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.1.26 Верните пробирки в магнитный штатив, аккуратно уберите оставшуюся жидкость со дна, не задевая магнитные частицы, с помощью дозатора, позволяющего отбирать объёмы жидкости 2,0–20 мкл.
- 7.2.1.27 Инкубируйте пробирки с открытой крышкой в течение 4 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C), не вынимая их из магнитного штатива.
- 7.2.1.28 Извлеките пробирки из магнитного штатива, добавьте 26 мкл элюирующего раствора TEL, встряхните в течение 5–10 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе. Инкубируйте пробирки в течение 2 минут при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
- 7.2.1.29 Верните пробирки в магнитный штатив, инкубируйте в течение 2–3 минут, пока жидкость не станет прозрачной.
- 7.2.1.30 Промаркируйте по одной одноразовой пустой пробирке объёмом 0,2 мл для каждого исследуемого образца.
- 7.2.1.31 Перенесите из пробирок в магнитном штативе в пробирки объёмом 0,2 мл с соответствующей маркировкой, не задевая магнитные частицы, по 24 мкл жидкости.
- 7.2.1.32 Инкубируйте пробирки с реагентом L1 и реагентом L3 при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирки в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! В пробирке с реагентом L1 возможно выпадение осадка. В этом случае следует встряхивать пробирку на микроцентрифуге-вортке до полного растворения осадка. Не допускается нагревания пробирки с реагентом L1. Не допускается использование реагента L1 с нерастворенным осадком.

7.2.1.33 Встряхните пробирку с ферментом-KFEx- в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортке и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортке.

ВНИМАНИЕ! Фермент-KFEx- следует извлекать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.1.34 Смешайте в отдельной пробирке объёмом 1,5 мл:

- 3,0 x (N+1) мкл реагента L1,
- 3,0 x (N+1) мкл реагента L3,
- 0,5 x (N+1) мкл фермента-KFEx-,

где N – количество исследуемых образцов.

Примечание – После каждого использования необходимо помещать используемые реагенты в морозильную камеру.

7.2.1.35 Закройте крышку пробирки, встряхните пробирку в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортке и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортке.

7.2.1.36 Осторожно добавьте в каждую промаркированную пробирку объёмом 0,2 мкл, содержащую подготавливаемые библиотеки, (отдельным наконечником для каждой пробирки) по 6,5 мкл приготовленной смеси, закройте крышки пробирок, встряхните пробирки в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортке и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортке.

7.2.1.37 Установите пробирки в блок амплификатора и проведите реакцию с учетом объёма реакционной смеси, равного 30 мкл, по программе, приведенной в таблице 3.

Таблица 3 – Программа амплификации

№ блока	Температура, °C	Время		Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
		мин	с			
1	37,0	30	00	1		Цикл
2	75,0	10	00	1		Цикл
3	4,0	...	...	Хранение		Хранение

7.2.1.38 После окончания термостатирования извлеките пробирки из амплификатора и поместите на рабочий стол.

7.2.2 Лигирование и очистка фрагментов ДНК

7.2.2.1 Возьмите необходимое количество стрипов с индексами.

- 7.2.2.2 Промаркируйте по одной пробирке с индексами для каждого исследуемого образца.
- 7.2.2.3 Перенесите в соответствующие пробирки стрипов с индексами, в каждую отдельным наконечником, по 30 мкл жидкости из пробирок после термостатирования.
- 7.2.2.4 Зафиксируйте в протоколе постановки соответствие номера индекса и образца с библиотекой (таблица 4).

Таблица 4 – Пример заполнения протокола постановки

№ образца	№ библиотеки	№ индекс
Образец 1	Пробирка 1	Индекс ts1
Образец 2	Пробирка 2	Индекс ts2
Образец 3	Пробирка 3	Индекс ts3
Образец 4	Пробирка 4	Индекс ts4
Образец 5	Пробирка 5	Индекс ts5
Образец 6	Пробирка 6	Индекс ts6

- 7.2.2.5 Инкубируйте пробирки с реагентом L1, реагентом L2 и реагентом K3 при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирки в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! В пробирке с реагентом L1 возможно выпадение осадка. В этом случае следует стряхивать пробирку на микроцентрифуге-вортексе до полного растворения осадка. Не допускается нагревания пробирки с реагентом L1. Не допускается использование реагента L1 с нерастворенным осадком.

- 7.2.2.6 Встряхните пробирку с ферментом-LIG в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Фермент-LIG следует извлекать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.2.2.7 Смешайте в отдельной пробирке объемом 1,5 мл:
- 1,5 x (N+1) мкл реагента L1,
 - 4,5 x (N+1) мкл реагента L2,
 - 2,3 x (N+1) мкл реагента K3,
 - 1,0 x (N+1) мкл фермента-LIG,
 - 5,7 x (N+1) мкл буфера для разведения ДНК,
- где N – количество исследуемых образцов.
- 7.2.2.8 Закройте крышку пробирки, встряхните пробирку в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

- 7.2.2.9 Осторожно добавьте в каждую промаркированную пробирку, содержащую смесь соответствующих индексов и подготавливаемых библиотек (см. 7.2.2.3), (отдельным наконечником для каждой пробирки) по 15 мкл приготовленной смеси, закройте крышки пробирок, встряхните пробирки в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.2.10 Установите пробирки в блок амплификатора и проведите реакцию с учетом объема реакционной смеси, равного 45 мкл, по программе, приведенной в таблице 5.

Таблица 5 – Программа амплификации

№ блока	Температура, °C	Время		Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
		мин	с			
1	17,0	60	00	1		Цикл
2	4,0	...	...	Хранение		Хранение

- 7.2.2.11 После окончания термостатирования извлеките пробирки из амплификатора и поместите на рабочий стол.
- 7.2.2.12 Встряхните флакон с раствором МЧ в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе до получения раствора равномерного коричневого цвета. Инкубируйте не менее 30 минут при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
- 7.2.2.13 Встряхните флакон с раствором МЧ в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе до получения раствора равномерного коричневого цвета перед использованием.
- 7.2.2.14 Промаркируйте по одной одноразовой пустой пробирке объемом 1,5 мл для каждого исследуемого образца.
- 7.2.2.15 Внесите в промаркированные пробирки объемом 1,5 мл по 45 мкл раствора МЧ и добавьте весь объем из соответствующей пробирки объемом 0,2 мл (см 7.2.2.10). Закройте крышки пробирок. Встряхните пробирки в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.2.16 Инкубируйте пробирки в течение 5 минут при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
- 7.2.2.17 Поместите пробирки в магнитный штатив.
- 7.2.2.18 Инкубируйте пробирки в течение 3 минут при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенки пробирки.
- 7.2.2.19 Удалите надосадочную жидкость с помощью дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.2.2.20 Добавьте в каждую пробирку 200 мкл 75% этанола.

- 7.2.2.21 Извлеките пробирки из магнитного штатива и поместите обратно, повернув каждую пробирку на 180 градусов. Повторите 4–5 раз.
- 7.2.2.22 Удалите надосадочную жидкость с помощью дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.2.2.23 Повторите 7.2.2.20–7.2.2.22.
- 7.2.2.24 Закройте крышки пробирок. Центрифугируйте пробирки в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.2.25 Верните пробирки в магнитный штатив, аккуратно уберите оставшуюся жидкость со дна, не задевая магнитные частицы, с помощью дозатора, позволяющего отбирать объёмы жидкости 2–20 мкл.
- 7.2.2.26 Инкубируйте пробирки с открытой крышкой в течение 4 мин при комнатной температуре от (18 °C до 25 °C), не вынимая из магнитного штатива.
- 7.2.2.27 Извлеките пробирки из магнитного штатива, добавьте 27 мкл элюирующего раствора TEL, встряхните в течение 5–10 с микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе. Инкубируйте в течение 2 минут при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
- 7.2.2.28 Верните пробирки в магнитный штатив инкубируйте в течение 2–3 минут, пока жидкость не станет прозрачной.
- 7.2.2.29 Промаркируйте по одной одноразовой пустой пробирке объёмом 0,2 мл для каждого исследуемого образца.
- 7.2.2.30 Перенесите в пробирку объёмом 0,2 мл с соответствующей маркировкой, не задевая магнитные частицы, по 25 мкл жидкости из пробирок в магнитном штативе.

Примечание – Допускается хранение продукта очистки при температуре от минус 18 °C до минус 22 °C не более 24 часов.

7.2.3 Проведение амплификации библиотек фрагментов ДНК и их очистка

- 7.2.3.1 Инкубируйте пробирку со смесью для амплификации библиотек ИЛМ при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирку в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.3.2 Встряхните пробирку с ферментом-POL в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Фермент-POL следует извлекать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.2.3.3 Смешайте в отдельной пробирке объёмом 1,5 мл:
 - 10 x (N+1) мкл смеси для амплификации библиотек ИЛМ,
 - 0,5 x (N+1) мкл фермента-POL,где N – количество исследуемых образцов.

- 7.2.3.4 Закройте крышку пробирки, встряхните пробирку в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.3.5 Осторожно добавьте в каждую промаркированную пробирку, содержащую подготавливаемые библиотеки, (отдельным наконечником для каждой пробирки) по 10 мкл приготовленной смеси, закройте крышки пробирок, встряхните пробирки в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.3.6 Установите все пробирки в блок амплификатора и проведите ПЦР-амплификацию с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл, по программе, приведенной в таблице 6:

Таблица 6 – Программа амплификации

№ блока	Температура, °C	Время		Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
		мин	с			
1	94,0	5	00	1		Цикл
2	94,0	0	15	6		Цикл
	58,0	0	15			
	70,0	1	00			
3	70,0	5	00	1		Цикл
4	10,0	...	...	Хранение		Хранение

- 7.2.3.7 После окончания амплификации извлеките пробирки из амплификатора и поместите на рабочий стол.
- 7.2.3.8 Встряхните флакон с раствором МЧ в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе до получения раствора равномерного коричневого цвета. Инкубируйте не менее 30 минут при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
- 7.2.3.9 Встряхните флакон с раствором МЧ в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе до получения раствора равномерного коричневого цвета перед использованием.
- 7.2.3.10 Промаркируйте по одной одноразовой пустой пробирке объемом 1,5 мл для каждого исследуемого образца.
- 7.2.3.11 Внесите в промаркированные пробирки объемом 1,5 мл по 35 мкл раствора МЧ и добавьте весь объем из соответствующей пробирки объемом 0,2 мл (7.3.6). Закройте крышки пробирок. Встряхните пробирки в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

- 7.2.3.12 Инкубируйте пробирки в течение 5 минут при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
- 7.2.3.13 Поместите пробирки в магнитный штатив.
- 7.2.3.14 Инкубируйте пробирки в течение 3 минут при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенки пробирки.
- 7.2.3.15 Удалите надосадочную жидкость дозатором, не задевая магнитные частицы.
- 7.2.3.16 Добавьте в каждую пробирку 200 мкл 75% этанола.
- 7.2.3.17 Извлеките пробирки из магнитного штатива и поместите обратно, повернув каждую пробирку на 180 градусов. Повторите 4–5 раз.
- 7.2.3.18 Удалите надосадочную жидкость дозатором, не задевая магнитные частицы.
- 7.2.3.19 Повторите 7.2.3.16–7.2.3.18.
- 7.2.3.20 Закройте крышки пробирок. Центрифугируйте пробирки в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.3.21 Верните пробирки в магнитный штатив, аккуратно уберите оставшуюся жидкость со дна, не задевая магнитные частицы, с помощью дозатора, позволяющего отбирать объёмы жидкости 2,0–20 мкл.
- 7.2.3.22 Инкубируйте пробирки с открытой крышкой в течение 4 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C), не вынимая из магнитного штатива.
- 7.2.3.23 Извлеките пробирки из магнитного штатива, добавьте 32 мкл элюирующего раствора TEL, встряхните в течение 5–10 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе. Инкубируйте в течение 2 минут при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
- 7.2.3.24 Верните пробирки в магнитный штатив, инкубируйте в течение 2–3 минут, пока жидкость не станет прозрачной.
- 7.2.3.25 Промаркируйте по одной одноразовой пустой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого исследуемого образца.
- 7.2.3.26 Внесите в промаркированные пробирки объёмом 1,5 мл по 30 мкл раствора МЧ.
- 7.2.3.27 Перенесите из пробирок в магнитном штативе в соответствующие пробирки объёмом 1,5 мл с раствором МЧ, не задевая магнитных частиц, по 30 мкл жидкости.
- 7.2.3.28 Закройте крышки пробирок. Встряхните пробирки в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.3.29 Инкубируйте пробирки в течение 5 минут при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
- 7.2.3.30 Поместите пробирки в магнитный штатив.
- 7.2.3.31 Инкубируйте пробирки в течение 3 минут при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенки пробирок.

- 7.2.3.32 Удалите надосадочную жидкость с помощью дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.2.3.33 Добавьте в каждую пробирку 200 мкл 75% этанола.
- 7.2.3.34 Извлеките пробирки из магнитного штатива и поместите обратно, повернув каждую пробирку на 180 градусов. Повторите 4–5 раз.
- 7.2.3.35 Удалите надосадочную жидкость с помощью дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.2.3.36 Повторите 7.2.3.33–7.2.3.35.
- 7.2.3.37 Закройте крышки пробирок. Центрифугируйте пробирки в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.3.38 Верните пробирки в магнитный штатив, аккуратно уберите оставшуюся жидкость со дна, не задевая магнитные частицы, с помощью дозатора, позволяющего отбирать объёмы жидкости 2,0–20 мкл.
- 7.2.3.39 Инкубируйте пробирки с открытыми крышками в течение 4 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С), не вынимая их из магнитного штатива.
- 7.2.3.40 Извлеките пробирки из магнитного штатива, добавьте по 27 мкл элюирующего раствора TEL, встряхните в течение 5–10 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе. Инкубируйте в течение 2 минут при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).
- 7.2.3.41 Верните пробирки в магнитный штатив инкубируйте в течение 2–3 минут, пока жидкость не станет прозрачной.
- 7.2.3.42 Промаркируйте по одной одноразовой пустой пробирке объёмом 0,5 мл для каждого исследуемого образца (таблица 7).

Таблица 7 – Пример маркировки пробирок для готовой библиотеки

№ образца	№ библиотеки
Образец 1	Пробирка «Lib1 ts1»
Образец 2	Пробирка «Lib2 ts2»
Образец 3	Пробирка «Lib3 ts3»

- 7.2.3.43 Перенесите в пробирки объёмом 0,5 мл с соответствующей маркировкой, не задевая магнитные частицы по 25 мкл жидкости из пробирок в магнитном штативе.

Примечание – Допускается хранение библиотеки при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более 1 месяца или в морозильной камере на минус 70 °С не более 1 года.

8 ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВА И КАЧЕСТВА БИБЛИОТЕКИ

8.1 Оценка количества и качества полученных библиотек

Проведите оценку количества и качества полученных пулов библиотек на флуориметре или флуоресцентном анализаторе согласно инструкции к набору реагентов и прибору.

Для оценки качественного профиля библиотеки (длины представленных в библиотеке фрагментов, долю лигированных продуктов) можно использовать метод горизонтального гель-электрофореза в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для детекции продуктов ПЦР методом гель-электрофореза.

8.2 На полученной электрофореграмме должен определяться пик, имеющий нормальное распределение длин от 270 до 340 п.н. Допускается наличие продуктов длиной более 340 п.н.

При проведении гель-электрофореза в каждой дорожке геля, в которую были внесены библиотеки, должна быть видна светящаяся полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту длиной от 270 до 340 п.н. Более короткие полосы должны отсутствовать. Допускается наличие светящихся полос, соответствующих фрагментам длиной более 340 п.н., и разной степени интенсивности.

8.3 Молярная концентрация библиотеки должна быть не менее 1000 пмоль/л.
Библиотеки готовы для дальнейшего проведения секвенирования.

9 ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Секвенирование библиотек следует проводить на приборе NextSeq™ 550Dx (Illumina, США) с использованием Комплекта реагентов для секвенирования из набора реагентов АнеуСкрин ИЛМ, согласно Приложению 4 к данной инструкции и Инструкции к прибору NextSeq.

Регистрация результатов секвенирования проводится прибором автоматически во время проведения секвенирования. Первичный анализ данных секвенирования осуществляется прибором после завершения программы.

10 АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Определение доли ДНК плода и риска наличия анеуплоидий по 13, 18, 21, X и Y хромосомам осуществляется с помощью программного обеспечения «АнеуСкрин» согласно Руководству пользователя к программному обеспечению. Программное обеспечение предназначено только для совместного применения с набором реагентов «АнеуСкрин ИЛМ». Рекомендуется пройти обучение. Контактные данные службы клиентской поддержки представлены в разделе 17 Инструкции по применению.

Программное обеспечение «АнеуСкрин» и Руководство пользователя предоставляется на USB-флеш-накопителе или представлено на Интернет-ресурсе компании-производителя.

Информация об Интернет-ресурсе для скачивания программного обеспечения и Руководства пользователя будет указана в инструкции к набору реагентов после получения регистрационного удостоверения на медицинское изделие.

11 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

11.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с холодоэлементами всеми видами крытого транспорта.

11.2 Условия транспортирования, хранения и эксплуатации набора реагентов приведены в таблицах 8.1, 8.2.

Таблица 8.1 – Условия транспортирования, хранения и эксплуатации для комплектаций В1 – В8

Коробка (часть x из 6)	Наименование	Температура транспортирования	Температура хранения	Температура хранения после вскрытия упаковки
Коробка 1 (часть 1 из 6)	Буфер для разведения ДНК	не выше 8 °С не более 5 суток	от минус 18 °С до минус 22 °С	от 2 °С до 8 °С
	Реагент К1			от минус 18 °С до минус 22 °С
	Реагент К2			
	Реагент К3			
	Фермент-KFR			
	Фермент-PNK			
	Реагент L1			
	Реагент L3			
	Фермент-KFEx-			
	Реагент L2			
	Фермент-LIG			
	Фермент-POL			
	Смесь для амплификации библиотек ИЛМ			от 2 °С до 8 °С
Коробка 2 (часть 2 из 6)	Индексы set 1 – set 8	от 2 °С до 25 °С не более 5 суток	от 2 °С до 25 °С	от 2 °С до 25 °С
	Раствор МЧ		от 2 °С до 8 °С	от 2 °С до 8 °С
	Элюирующий раствор TEL			
Коробка 3 (часть 3 из 6)	Буфер HT1	не выше 8 °С не более 5 суток	от минус 15 °С до минус 25 °С	от минус 15 °С до минус 25 °С
Коробка 4 (часть 4 из 6)	Картридж с реагентами			
Коробка 5 (часть 5 из 6)	Проточная ячейка	от 2 °С до 25 °С не более 5 суток	от 2 °С до 8 °С	от 2 °С до 8 °С
Коробка 6 (часть 6 из 6)	Картридж с буфером		от 15 °С до 30 °С	от 15 °С до 30 °С

Таблица 8.2 – Условия транспортирования, хранения и эксплуатации для комплектаций А1 – А8

Коробка (часть x из 2)	Наименование	Температура транспортирования	Температура хранения	Температура хранения после вскрытия упаковки
Коробка 1 (часть 1 из 2)	Буфер для разведения ДНК	не выше 8 °С не более 5 суток	от минус 18 °С до минус 22 °С	от 2 °С до 8 °С
	Реагент К1			от минус 18 °С до минус 22 °С
	Реагент К2			
	Реагент К3			
	Фермент-KFR			
	Фермент-PNK			
	Реагент L1			
	Реагент L3			
	Фермент-KFEx-			
	Реагент L2			
	Фермент-LIG			
	Фермент-POL			
	Смесь для амплификации библиотек ИЛМ			от 2 °С до 8 °С
Коробка 2 (часть 2 из 2)	Индексы set 1 – set 8	от 2 °С до 25 °С не более 5 суток	от 2 °С до 25 °С	от 2 °С до 25 °С
	Раствор МЧ		от 2 °С до 8 °С	от 2 °С до 8 °С
	Элюирующий раствор TEL			

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

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

11.5 Наборы реагентов следует хранить в холодильнике, холодильной или морозильной камере при температурах, указанных в таблицах 8.1, 8.2, в течение всего срока годности набора реагентов. Допускается хранение индексов в шкафу при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

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

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

11.8 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

12 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

12.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПин 2.1.3684-2021 и МУ 1.3.2569-09.

12.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПин 2.1.3684-2021.

13 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

13.2 Срок годности набора реагентов и контрольных образцов к набору реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

14 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

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

15 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Температурный диапазон
	Количество тестов
	Годен до
	Серия набора реагентов
	Нестерильно
	Обратитесь к инструкции по применению
	Каталожный номер
	Адрес изготовителя
	Не допускается воздействие солнечного света

16 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-2019 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. 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 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 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

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

Примечания:

1. 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.
2. Перечень стандартов, относящихся к программному обеспечению, приведён в руководстве пользователя.

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

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов АнеуСкрин ИЛМ, 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

www.dna-technology.ru

Приложение 1

Индексы набора реагентов АнеуСкрин ИЛМ

Комплектации набора реагентов отличаются между собой индексами, включенными в состав комплекта реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК. Индексы объединены в сетки (set) по 6 стрипов по 8 пробирок. Каждая пробирка стрипа промаркирована (указан индекс).

Индексы set 1 (ts1 – ts48)

ts1	ts2	ts3	ts4	ts5	ts6	ts7	ts8
ts9	ts10	ts11	ts12	ts13	ts14	ts15	ts16
ts17	ts18	ts19	ts20	ts21	ts22	ts23	ts24
ts25	ts26	ts27	ts28	ts29	ts30	ts31	ts32
ts33	ts34	ts35	ts36	ts37	ts38	ts39	ts40
ts41	ts42	ts43	ts44	ts45	ts46	ts47	ts48

Индексы set 2 (ts49 – ts96)

ts49	ts50	ts51	ts52	ts53	ts54	ts55	ts56
ts57	ts58	ts59	ts60	ts61	ts62	ts63	ts64
ts65	ts66	ts67	ts68	ts69	ts70	ts71	ts72
ts73	ts74	ts75	ts76	ts77	ts78	ts79	ts80
ts81	ts82	ts83	ts84	ts85	ts86	ts87	ts88
ts89	ts90	ts91	ts92	ts93	ts94	ts95	ts96

Индексы set 3 (ts97 – ts144)

ts97	ts98	ts99	ts100	ts101	ts102	ts103	ts104
ts105	ts106	ts107	ts108	ts109	ts110	ts111	ts112
ts113	ts114	ts115	ts116	ts117	ts118	ts119	ts120
ts121	ts122	ts123	ts124	ts125	ts126	ts127	ts128
ts129	ts130	ts131	ts132	ts133	ts134	ts135	ts136
ts137	ts138	ts139	ts140	ts141	ts142	ts143	ts144

Индексы set 4 (ts145 – ts192)

ts145	ts146	ts147	ts148	ts149	ts150	ts151	ts152
ts153	ts154	ts155	ts156	ts157	ts158	ts159	ts160
ts161	ts162	ts163	ts164	ts165	ts166	ts167	ts168
ts169	ts170	ts171	ts172	ts173	ts174	ts175	ts176
ts177	ts178	ts179	ts180	ts181	ts182	ts183	ts184
ts185	ts186	ts187	ts188	ts189	ts190	ts191	ts192

Индексы set 5 (ts193 – ts240)

ts193	ts194	ts195	ts196	ts197	ts198	ts199	ts200
ts201	ts202	ts203	ts204	ts205	ts206	ts207	ts208
ts209	ts210	ts211	ts212	ts213	ts214	ts215	ts216
ts217	ts218	ts219	ts220	ts221	ts222	ts223	ts224
ts225	ts226	ts227	ts228	ts229	ts230	ts231	ts232
ts233	ts234	ts235	ts236	ts237	ts238	ts239	ts240

Индексы set 6 (ts241 – ts288)

ts241	ts242	ts243	ts244	ts245	ts246	ts247	ts248
ts249	ts250	ts251	ts252	ts253	ts254	ts255	ts256
ts257	ts258	ts259	ts260	ts261	ts262	ts263	ts264
ts265	ts266	ts267	ts268	ts269	ts270	ts271	ts272
ts273	ts274	ts275	ts276	ts277	ts278	ts279	ts280
ts281	ts282	ts283	ts284	ts285	ts286	ts287	ts288

Индексы set 7 (ts289 – ts336)

ts289	ts290	ts291	ts292	ts293	ts294	ts295	ts296
ts297	ts298	ts299	ts300	ts301	ts302	ts303	ts304
ts305	ts306	ts307	ts308	ts309	ts310	ts311	ts312
ts313	ts314	ts315	ts316	ts317	ts318	ts319	ts320
ts321	ts322	ts323	ts324	ts325	ts326	ts327	ts328
ts329	ts330	ts331	ts332	ts333	ts334	ts335	ts336

Индексы set 8 (ts337 – ts384)

ts337	ts338	ts339	ts340	ts341	ts342	ts343	ts344
ts345	ts346	ts347	ts348	ts349	ts350	ts351	ts352
ts353	ts354	ts355	ts356	ts357	ts358	ts359	ts360
ts361	ts362	ts363	ts364	ts365	ts366	ts367	ts368
ts369	ts370	ts371	ts372	ts373	ts374	ts375	ts376
ts377	ts378	ts379	ts380	ts381	ts382	ts383	ts384

Приложение 2

Исследование внеклеточной ДНК с использованием NGS состоит из следующих этапов:

№	Этап	Участие набора реагентов «АнеуСкрин ИЛМ»
1	Получение биологического материала	–
2	Выделение ДНК	–
3	Оценка качества и количества полученной ДНК	–
4	Подготовка ДНК к лигированию (обработка «концов»)	1) Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК
7	Промежуточная очистка фрагментов ДНК	1) Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК
5	Оценка качества полученных ампликонов	–
6	Присоединение индексов	1) Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК
7	Промежуточная очистка фрагментов ДНК	1) Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК
8	Дополнительная амплификация	1) Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК
9	Финальная очистка библиотеки	1) Комплект реагентов для подготовки и очистки библиотек фрагментов ДНК
10	Оценка количества и качества полученной библиотеки	–
11	ПЦР обогащения	2) Комплект реагентов для секвенирования
12	Проведение секвенирования	2) Комплект реагентов для секвенирования
13	Регистрация и обработка результата	2) Комплект реагентов для секвенирования
14	Анализ полученных данных. Заключение	3) Программное обеспечение «АнеуСкрин»

Проведение секвенирования

I. Подготовка к проведению секвенирования: денатурирование и разбавление библиотек

Подготовка и проведение секвенирования проводится в соответствии с Инструкцией к прибору NextSeq (Illumina, USA).

Данное приложение составлено на основе «Руководства по денатурированию и разбавлению библиотек для системы NextSeq 500 и NextSeq 550 (документ № 15048776)», адаптировано к набору реагентов АнеуСкрин ИЛМ.

Для разведения и денатурирования библиотек требуются следующие реагенты и расходные материалы:

- «HT1 Hyb Buffer 1» (Буфер HT1) из комплекта реагентов для проведения секвенирования;
- 1,0 М раствор NaOH (для молекулярно-биологических исследований);
- деионизированная вода (для молекулярно-биологических исследований);
- реагент PhiX Control производства Illumina, USA (Кат. номер FC-110-3001);
- одноразовые пробирки объемом 1,5 мл.

1. Подготовка реагентов для денатурирования и разведения библиотек

1.1 Приготовьте свежий раствор 0,2 М NaOH.

Для этого смешайте в отдельной пробирке 1,5 мл:

- 400 мкл деионизированной воды;
- 100 мкл 1 М NaOH.

Встряхните пробирку с 0,2 М NaOH в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Приготовленный раствор следует хранить не более 12 часов.

1.2 Подготовьте буфер HT1:

Разморозьте буфер HT1 из Комплекта реагентов для секвенирования при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

2. Приготовление библиотеки с концентрацией 0,5 нМ

2.1 Готовые библиотеки (см. 8.4) смешайте эквимольно. Повторите измерение концентрации полученного пула библиотек или рассчитайте его концентрацию.

2.2 Рассчитайте кратность разведения полученной библиотеки:

$$Y = X/0,5,$$

где Y – кратность разведения библиотеки (п.2.1),

X – концентрация библиотеки (п.2.1).

2.3 Разведите библиотеку до концентрации 0,5 нМ

Для этого смешайте в отдельной пробирке объемом 1,5 мл:

- 5,0 мкл библиотеки,
- (5,0*Y) – 5,0 мкл деионизированной воды,

где Y – кратность разведения для данной библиотеки.

- 2.4 Встряхните пробирку с библиотекой 0,5 нМ в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

3. Денатурирование библиотеки

- 3.1 Смешайте в отдельной пробирке объемом 1,5 мл:
- 40 мкл Библиотеки 0,5 нМ,
 - 40 мкл 0,2 М NaOH.
- 3.2 Встряхните пробирку в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 3.3 Инкубируйте пробирку в течение 5 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).
- 3.4 Добавьте в пробирку 40 мкл деионизированной воды. Встряхните пробирку в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

4. Приготовление библиотеки с концентрацией 20 пМ

- 4.1 Разведите библиотеку до 20 пМ:
- Добавьте к 120 мкл денатурированной библиотеки 880 мкл буфера HT1, предварительно инкубированного при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С). В результате получится 1,0 мл денатурированной 20 пМ библиотеки.
- 4.2 Встряхните пробирку в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

5. Приготовление библиотеки с концентрацией 1,8 пМ

- 5.1 Разведите денатурированную библиотеку до 1,8 пМ.
- Для этого смешайте в отдельной пробирке объемом 1,5 мл:
- 117 мкл библиотеки 20 пМ,
 - 1183 мкл буфера HT1.
- В результате получится 1,3 мл денатурированной 1,8 пМ библиотеки.
- 5.2 Встряхните пробирку в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

6. Приготовление 4 нМ PhiX Control

- 6.1 Разведите PhiX Control до 4,0 нМ.
- Для этого смешайте в отдельной пробирке объемом 1,5:
- 3 мкл деионизированной воды,
 - 2 мкл PhiX Control (исходная концентрация 10 нМ).
- 6.2 Встряхните пробирку в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7. Денатурирование PhiX Control

- 7.1 Денатурируйте 4 нМ PhiX Control.
- 7.2 Для этого в пробирку с PhiX Control (концентрация 4,0 нМ) добавьте 5,0 мкл 0,2 М NaOH.

- 7.3 Встряхните пробирку в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4 Инкубируйте пробирку в течение 5 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
- 7.5 Добавьте 5 мкл деионизированной воды. Встряхните пробирку в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

8. Приготовление 20 пМ PhiX Control

- 8.1 Разведите PhiX Control до 20 пМ. Для этого к 15 мкл денатурированного PhiX Control добавьте 985 мкл буфера HT1, предварительно инкубированного при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
- 8.2 Встряхните пробирку в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

9. Приготовление 1,8 пМ PhiX Control

Развести PhiX Control до 1,8 пМ.

Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 117 мкл PhiX Control 20 пМ,
- 1183 мкл буфера HT1.

10. Приготовление смеси библиотеки и PhiX

Смешайте в отдельной пробирке:

- 1287 мкл библиотеки (1,8 пМ),
- 13 мкл PhiX Control (1,8 пМ).

Библиотека в смеси с PhiX Control готова к загрузке в картридж для проведения секвенирования. Хранить на льду до загрузки в картридж с реагентами.

II. Подготовка реагентов из комплекта реагентов для проведения секвенирования к загрузке в прибор

1. Размораживание картриджа с реагентом

- 1.1 Извлеките NextSeq® 500/550 High Output Reagent Cartridge v2 (Картридж с реагентом). Картридж хранится при температуре от –15°C до –25°C.
- 1.2 Поместите картридж с реагентом на водяную баню, содержащую достаточное количество деионизированной воды комнатной температуры (от 18 °C до 25 °C) для погружения основания картриджа с реагентом. Не допускайте превышения максимального уровня воды, указанного на картриджах с реагентами.
- 1.3 Картридж с реагентами необходимо размораживать на водяной бане комнатной температуры (от 18 °C до 25 °C) в течение примерно 60 минут или до полного оттаивания.
- 1.4 Извлеките картридж из водяной бани и осторожно постучите им по столу для удаления воды из основания картриджа. Высушите основание картриджа.

2. Проверка картриджа с реагентом

- 2.1 Переверните картридж с реагентами десять раз, чтобы смешать размороженные реагенты, а затем визуально проверьте, что все позиции разморожены.
- 2.2 Визуально проверьте реагенты в положениях 29, 30, 31 и 32, чтобы убедиться, что они полностью перемешаны и не содержат осадков.
- 2.3 Осторожно постучите картридж по столу, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха в реагентах.

Примечание – Сипперы NextSeq опускаются на дно каждого резервуара для всасывания реагентов, поэтому важно, чтобы резервуары были свободны от воздушных пузырьков.

- 2.4 Поместите картридж с реагентом на лед или оставьте на время (до 6 часов) при температуре от 2 °C до 8 °C до готовности к работе. Для получения наилучших результатов перейдите непосредственно к загрузке образца и настройке запуска: Загрузите библиотеку в картридж с реагентами в ячейку 10, промаркированную Load Library Here (Загрузка образцов).

Используя интерфейс контрольного программного обеспечения NextSeq, выполните шаги настройки запуска, чтобы загрузить проточную ячейку и реагенты, а затем запустите постановку.

Проведите запуск прибора NextSeq согласно инструкции к прибору.

Приложение 4 (справочное)

Номограмма и формула перевода относительного ускорения центрифуги (RCF) в скорость вращения (RPM) в зависимости от диаметра ротора

