



Паспорт качества № XXXXXX

Набор реагентов для выявления мутаций, ассоциированных муковисцидозом, фенилкетонурией, галактоземией и нейросенсорной несиндромальной тугоухостью методом ПЦР в режиме реального времени (МоногенСкрин)

Фасовка: А
Серия: XXXXXX-X
Дата изготовления: XXXX-XX-XX
Срок годности: до XXXX-XX-XX*

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 21.20.23-105-46482062-2018.
2. Проверка состава набора и внешнего вида компонентов

Компонент	Количество	Характеристика и норма	Условия хранения и транспортирования	Результат
Смеси для амплификации Стрим (16 наименований)	1 двойной стрип	Прозрачная голубая или светло-розовая жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответству
Полимераза ТехноТад МАХ	2 пробирки	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	от минус 18 °С до минус 22 °С	Соответству
ПЦР-буфер Стрим	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответству
Буфер для разведения ДНК	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответству
Положительный контрольный образец	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответству
Стрипы по 8 пробирок	10 штук	-	-	Соответству
Крышки для стрипов	2 шт.	-	-	Соответству

3. Проверка функциональных показателей

Функциональный показатель	Характеристика и норма	Результат
Предел обнаружения: 5,0 нг	При тестировании комплекта лабораторных контрольных образцов – определение соответствующего генотипа	Соответству
Аналитическая специфичность	При тестировании комплекта лабораторных контрольных образцов – определение соответствующего генотипа. При тестировании отрицательного контрольного образца – определение «недостовверного» результата	Соответству

Заключение ОТК: соответствует требованиям ТУ 21.20.23-105-46482062-2
Дата выдачи паспорта: XXXX-XX-XX

*Срок годности 12 месяцев от даты изготовления



ООО «ДНК-Технология ТС»

Паспорт качества

Комплект лабораторных контрольных образцов
для набора реагентов для выявления мутаций, ассоциированных с муковисцидозом,
фенилкетонурией, галактоземией и нейросенсорной несиндромальной
тугоухостью методом ПЦР в режиме реального времени
(МоногенСкрин) по ТУ 21.20.23-105-46482062-2018

Серия: D1312
Дата изготовления: 13.12.2018
Срок годности: до 13.12.2019
Количество наборов в серии: 2
Условия хранения и транспортирования: от 2 °С до 8 °С

Результат контроля

Наименование лабораторного контрольного образца	Концентрация ДНК, копий на амплификационную пробирку	Контролируемый показатель	Результат генотипирования	Соответствие
ЛКО-1	1500	CFTR: 3944delGT	m / m	Соответствует
		CFTR: F508del	m / m	Соответствует
ЛКО-2	1500	GALT: K285N	m / m	Соответствует
		CFTR: N1303K	m / m	Соответствует
ЛКО-3	1500	CFTR: 1677delTA	m / m	Соответствует
		CFTR: 3849+10kbC>T	m / m	Соответствует
ЛКО-4	1500	PAH: IVS10nt546	m / m	Соответствует
		CFTR: W1282X	m / m	Соответствует
ЛКО-5	1500	PAH: R261Q	m / m	Соответствует
		CFTR: E92K	m / m	Соответствует
ЛКО-6	1500	PAH: E280K	m / m	Соответствует
		PAH: R408W	m / m	Соответствует
ЛКО-7	1500	PAH: P281L	m / m	Соответствует
		CFTR: G542X	m / m	Соответствует
ЛКО-8	1500	PAH: IVS12+IG>A	m / m	Соответствует
		PAH: Y414C	m / m	Соответствует
ЛКО-9	1500	PAH: IVS4+5G>T	m / m	Соответствует
		PAH: R158Q	m / m	Соответствует
ЛКО-10	1500	CFTR: 2143delT	m / m	Соответствует
		CFTR: R334W	m / m	Соответствует
ЛКО-11	1500	PAH: R252W	m / m	Соответствует
		CFTR: 394delTT	m / m	Соответствует
ЛКО-12	1500	CFTR: 2184insA	m / m	Соответствует
		CFTR: 3821delT	m / m	Соответствует
ЛКО-13	1500	CFTR: S466X	m / m	Соответствует
		GALT: N314D	m / m	Соответствует
ЛКО-14	1500	GJB2: 35delG	m / m	Соответствует
ЛКО-15	1500	CFTR: dele2,3 (21kb)	m / m	Соответствует
		PAH: D222X	m / m	Соответствует
ЛКО-16	1500	GALT: Q188R	m / m	Соответствует
		BK	+	Соответствует

Заключение: соответствует требованиям производственного регламента № 24.
Дата выдачи паспорта: 14.12.2018
ФИО ответственного лица: ст. лаборант УППК Богатова О.В.



Организация-производитель
СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор
ООО «ДНК-Технология ТС»

С.А. Самарин
« 13 » 13 апреля 2021 г.



Организация-разработчик
УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «НПФ ДНК-Технология»

С.П. Левичев
« 13 » 13 апреля 2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов для выявления мутаций, ассоциированных с муковисцидозом,
фенилкетонурией, галактоземией и нейросенсорной несиндромальной тугоухостью
методом ПЦР в режиме реального времени
(МоногенСкрин) по ТУ 21.20.23-105-46482062-2018**

2021 г.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

ПО	- программное обеспечение
ЛИС	- лабораторная информационная система
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ВК	- внутренний контроль
К+	- положительный контрольный образец
К-	- отрицательный контрольный образец
ДИ	- доверительный интервал

ВВЕДЕНИЕ

Моногенные заболевания – одна из подгрупп наследственных заболеваний, т.е. заболеваний, обусловленных нарушениями в процессах хранения, передачи и реализации генетической информации. Отличительной особенностью моногенных заболеваний является то, что они наследуются в соответствии с законами классической генетики Менделя.

Известно несколько тысяч моногенных заболеваний, многие из которых связаны с мутациями в генах, ассоциированными с нарушениями в работе ферментов. Распространенными моногенными заболеваниями на территории Российской Федерации являются муковисцидоз, фенилкетонурия, нейросенсорная несиндромальная тугоухость и галактоземия.

Научное обоснование

Муковисцидоз или кистозный фиброз – наследственное заболевание, сопровождающееся существенным снижением качества и продолжительности жизни. У больных муковисцидозом поражены многие органы, особенно выделяющие слизистый секрет: верхние и нижние дыхательные пути, поджелудочная железа, желчевыводящая система, кишечник, мужские половые органы, потовые железы. В среднем с этим заболеванием среди европейцев рождается один человек на 2500–4500 [1].

Фенилкетонурия – наследственное заболевание обмена веществ, связанное с нарушением метаболизма аминокислот, главным образом фенилаланина. Без корректной терапии фенилкетонурия сопровождается накоплением фенилаланина и его токсических продуктов в организме, что приводит к тяжелому поражению центральной нервной системы и нарушению умственного развития. В России частота рождения ребенка с фенилкетонурией составляет примерно один случай на 10 000 новорожденных, с частотой носительства по литературным данным примерно 1 : 50 [2].

Нейросенсорная несиндромальная тугоухость – наследственное заболевание (OMIM 220290), связанное с врожденным нарушением слуховой функции. Частота носительства мутации GJB2: 35delG может варьировать от 1 : 100 до 1 : 30 для европейских популяций и от 1 : 50 до 1 : 25 для некоторых российских популяций [3].

Галактоземия – наследственное заболевание, обусловленное пониженной активностью ферментов участвующих в превращении галактозы в глюкозу. Галактоза поступает в организм с пищей в составе дисахарида – лактозы (молочный сахар). Наибольшие изменения возникают в печени, почках, хрусталике глаза, мозге. Без лечения больные погибают в первые месяцы жизни от инфекций, сепсиса или печеночной недостаточности, у всех больных развивается умственная отсталость с характерными нарушениями речи

(хаотичная речь). При раннем назначении диеты дети могут развиваться нормально. Галактоземия в Российской популяции встречается в среднем у 1 : 20 000 новорожденных [4].

Юридическое обоснование

В Российской Федерации с 2006 г. в рамках реализации приоритетного национального проекта «Здоровье» (приказ Минздравсоцразвития РФ от 22.03.2006 № 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания») проводят неонатальный скрининг на пять подобных заболеваний, включая муковисцидоз, фенилкетонурию и галактоземию, также проводится аудиометрический скрининг и оценка зрения у новорожденного. В ряде стран, учитывая высокую частоту носительства при сравнительно небольшом количестве мажорных мутаций в генах CFTR, PAH и GJB2, скрининг на наиболее частые мутации предлагают проводить всем парам, планирующим деторождение.

Аллельная частота мутаций, определяемых наборов реагентов МоногенСкрин, в Российской Федерации у больных моногенными наследственными заболеваниями

Муковисцидоз

Мутации генов CFTR, PAH, GALT, GJB2, выявляемые набором МоногенСкрин	Частота встречаемости в РФ у больных [5]	Частота встречаемости в РФ у больных [6]	Частота встречаемости в РФ у больных [7]
CFTR: F508del	54,20%	51,53%	52,8%
CFTR: dele2,3 (21kb)	7,20%	5,93%	6,2%
CFTR: E92K	-	2,62%	3,0%
CFTR: 2184insA	1,70%	1,80%	1,8%
CFTR: 3849+10kbC>T	1,90%	2,14%	2,0%
CFTR: 2143delT	2,10%	1,69%	2,1%
CFTR: N1303K	1,90%	1,43%	1,5%
CFTR: G542X	1,30%	1,16%	1,3%
CFTR: W1282X	2,00%	0,13%	0,6%
CFTR: 394delTT	0,50%	0,85%	0,9%
CFTR: 1677delTA	0,80%	0,98%	1,8%
CFTR: R334W	0,70%	0,85%	0,8%
CFTR: 3821delT	0,80%	0,45%	0,5%
CFTR: S466X C>G	-	0,37%	0,5%
CFTR: 3944delGT	0,20%	0,21%	0,3%
ИТОГО	>70%	>70%	>75%

Фенилкетонурия

	Частота встречаемости в РФ у больных [8]	Частота встречаемости в РФ у больных [9]
PAH: R408W C>T	50,90%	47,90%
PAH: R261Q G>A	5,30%	9,90%
PAH: P281L C>T	3,50%	0,70%
PAH: IVS12+1G>A	3,10%	4,20%
PAH: IVS10nt546 G>A	2,60%	4,20%
PAH: R158Q G>A	2,10%	3,50%
PAH: R252W C>T	1,60%	2,10%
PAH: D222X -/TC	1,40%	2,10%
PAH: Y414C A>G	1,20%	2,80%
PAH: IVS4+5G>T	1,20%	2,80%
PAH: E280K G>A	1,20%	0,70%
ИТОГО	>70%	>80%

Галактоземия

	Частота встречаемости в РФ у больных [10]
GALT: Q188R	56,4%
GALT: K285N G>T	13,8%
ИТОГО	>70%
GALT: N314D A>G (полиморфизм Дуарте)	7%

Несиндромальная нейросенсорная тугоухость

	Частота встречаемости в РФ у больных [11]	Частота встречаемости в РФ у больных [12]
GJB2: 35delG	79,6%	87%

Список литературы

1. Кусова З.А., Петрова Н.В., Васильева Т.А. и др. Результаты массового скрининга новорожденных на муковисцидоз в Москве // *Вопр. соврем. педиатр.* – 2010. – Т. 9. – № 6. – С. 26-30.
2. Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe // *Hum Mutat.* – 2003. – Vol. 21 (4). – P. 345-356.
3. Некрасова Н.Ю., Шагина И.А., Петрин А.Н., Поляков А.В. Частота мутации 35delG в гене коннексина 26 у детей страдающих ранней детской нейросенсорной тугоухостью // *Мед. ген.* – 2002. – Т.1. – № 6. – С. 290-294.
4. Яблонская М.И., Новиков П.В., Боровик Т.Э. и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению галактоземии // Москва, 2013. – 20 с.
5. Петрова Н.В. Молекулярно-генетические и клинико-генотипические особенности муковисцидоза в российских популяциях: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2009.
6. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2014 год. – М.: ИД «МЕДПРАКТИКА-М», 2015, 64 с.
7. Петрова Н.В. и др. Особенности спектра патогенных генетических вариантов гена CFTR у больных муковисцидозом из Российской Федерации. *Сибирское медицинское обозрение.* 2019;(2):47-59.
8. Gundorova P, Stepanova AA, Kuznetsova IA, Kutsev SI, Polyakov AV (2019) Genotypes of 2579 patients with phenylketonuria reveal a high rate of BH4 non-responders in Russia. *PLoS ONE* 14(1): e0211048.
9. Никифорова, А. И., Абрамов, Д. Д., Кадочникова, В. В., Зобкова, Г. Ю., Огурцова, К. А., Брюханова, Н. О. и др. Определение частоты встречаемости мутаций в гене *PAH* с применением комбинации технологий ПЦР «в реальном времени» и высокопроизводительного секвенирования у больных фенилкетонурией Московского региона // *Вестник РГМУ.* 2017. №4. С. 42–49.
10. Воскобоева Е.Ю., Байдакова Г.В., Денисенков А.И. и др. Галактоземия в России: молекулярно-генетические особенности, неонатальный скрининг, подтверждающая диагностика // *Медицинская генетика.* — 2009. — №6. — С.25-33.
11. Лалаянц М.Р., Маркова Т.Г., Бахшиян В.В., Близнец Е.А., Поляков А.В., Таварткиладзе Г.А. Аудиологическая картина и распространенность GJB2-обусловленной сенсоневральной тугоухости среди младенцев с нарушением слуха. *Вестник оториноларингологии.* 2014. № 2. С. 37-43.
12. Маркова Татьяна Геннадьевна. Клинико-генетический анализ врожденной и доречевой тугоухости : дисс... д-ра мед. наук. - Москва, 2008. - 260 с.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Назначение: Набор реагентов МоногенСкрин предназначен для выявления основных мутаций в генах человека CFTR, PAH, GALT и GJB2, ассоциированных с наследственными заболеваниями (муковисцидоз, фенилкетонурия, галактоземия и нейросенсорная несиндромальная тугоухость) методом ПЦР в режиме реального времени в препаратах ДНК, выделенных из периферической крови и сухих пятен крови.

1.2 Функциональное назначение: скрининг.

1.3 Показания к проведению исследования: неонатальный скрининг новорожденных; прегравидарная подготовка.

1.4 Набор реагентов может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

1.5 Популяционные и демографические аспекты: проведение скрининга новорождённых, обследование пар, планирующих деторождение; набор разработан с учётом частот встречаемости мутаций в Российской Федерации. Противопоказаний к применению нет.

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

1.7 Применять набор строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

Набор реагентов для выявления мутаций, ассоциированных с муковисцидозом, фенилкетонурией, галактоземией и нейросенсорной несиндромальной тугоухостью методом ПЦР в режиме реального времени (МоногенСкрин) по ТУ 21.20.23-105-46482062-2018 (далее по тексту набор реагентов) выпускается в фасовке для автоматизированного дозирования (маркируется – фасовка А) и включает следующие компоненты:

REF R1-H953-XA/5, фасовка А			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации Стрим (16 наименований)	Прозрачная голубая или светло-розовая жидкость	1 двойной стрип	по 120 мкл
Полимераза ТехноТақ МАХ	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2 пробирки	по 60 мкл
ПЦР-буфер Стрим	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 600 мкл
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 100 мкл
Стрипы по 8 пробирок	10 шт.		
Крышки для стрипов	2 шт.		

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов предназначен для однократного применения и рассчитан на проведение 24 определений, что соответствует исследованию не более 22 неизвестных образцов, положительного контрольного образца и отрицательного контрольного образца. Объём положительного контрольного образца рассчитан на 2 определения.

Возможна постановка, предполагающая единовременно 24 определения, или две постановки по 12 определений.

2.3 Принцип метода

Метод: полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени, анализ кривых плавления, качественный анализ.

Принцип метода основан на амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации

ДНК, отжига праймеров, комплементарных специфическому участку ДНК, и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В смесь для амплификации введены сигнальные зонды, содержащие флуоресцентные метки Fam и Hex или Rox и Cy5, для каждой выявляемой мутации. После окончания ПЦР проводится раунд температурного плавления дуплексов, образованных ампликонами и сигнальными зондами, в результате чего изменяется уровень флуоресценции, который фиксируется и представляется программным обеспечением прибора в виде графика. Если сигнальный зонд частично комплементарен ДНК-мишени, температура плавления такого дуплекса будет ниже температуры плавления дуплекса в случае полной комплементарности зонда. На основании температуры плавления сигнальных зондов проводится интерпретация результатов анализа.

В состав одной смеси для амплификации включена система для амплификации фрагмента геномной ДНК человека – внутренний контроль (ВК), который позволяет контролировать количество ДНК в амплификационной пробирке и исключить ошибки генотипирования.

Система для амплификации геномной ДНК человека включает ДНК-зонд, который содержит флуоресцентную метку (Cy5) и гаситель флуоресценции.

При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) возрастает пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке. В таблице 1 представлены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Состав стрипов, цветовая маркировка и каналы детекции продуктов амплификации

№ пробирки в стрипе	Мутация (наименование смеси для амплификации)	Каналы детекции аллельных вариантов и внутреннего контроля					Цветовая маркировка смеси для амплификации
		Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5	
Стрип 1							
1	CFTR: 3944delGT	N ²	m ³	-	-	-	Светло-розовая
	CFTR: F508del	-	-	N	m	-	
2	GALT: K285N	N	m	-	-	-	
	CFTR: N1303K	-	-	N	m	-	
3	CFTR: 1677delTA	N	m	-	-	-	
	CFTR: 3849+10kbC>T	-	-	N	m	-	
4	PAH: IVS10nt546	N	m	-	-	-	
	CFTR: W1282X	-	-	N	m	-	
5	PAH: R261Q	N	m	-	-	-	
	CFTR: E92K	-	-	N	m	-	
6	PAH: E280K	N	m	-	-	-	
	PAH: R408W	-	-	N	m	-	
7	PAH: P281L	N	m	-	-	-	
	CFTR:G542X	-	-	N	m	-	
8	PAH: IVS12+1G>A	N	m	-	-	-	
	PAH: Y414C	-	-	N	m	-	
Стрип 2							
1	PAH: IVS4+5G>T	N	m	-	-	-	Светло-розовая
	PAH: R158Q	-	-	N	m	-	
2	CFTR: 2143delT	N	m	-	-	-	
	CFTR: R334W	-	-	N	m	-	
3	PAH: R252W	N	m	-	-	-	
	CFTR: 394delTT	-	-	N	m	-	
4	CFTR: 2184insA	N	m	-	-	-	
	CFTR: 3821delT	-	-	N	m	-	
5	CFTR: S466X	N	m	-	-	-	
	GALT: N314D	-	-	N	m	-	
6	GJB2: 35delG	N	m	-	-	-	
7	CFTR: dele2,3 (21kb)	N	m	-	-	-	
	PAH: D222X	-	-	N	m	-	
8	GALT: Q188R	N	m	-	-	-	
	BK ¹	-	-	-	+	-	

¹ Система внутреннего контроля (БК), представляет собой систему амплификации геномной ДНК человека, позволяет оценить её количество в препарате ДНК и исключить ошибки генотипирования.

² Норма

³ Мутация

¹ Система внутреннего контроля (БК), представляет собой систему амплификации геномной ДНК человека, позволяет оценить её количество в препарате ДНК и исключить ошибки генотипирования.

² Норма

³ Мутация

Исследование с использованием набора реагентов МоногенСкрин состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация с детекцией результатов в режиме реального времени.

Для контроля определения частой и редкой гомозигот при проведении исследования используют положительный контрольный образец к набору реагентов МоногенСкрин.

Положительный контрольный образец представляет собой смесь клонированных участков генов CFTR, PAH, GALT и GJB2, находящихся в частом гомозиготном состоянии и выявляемых с применением набора, и предназначен для контроля качества исследования (определения гомозигот по нормальному аллелю) конечным пользователем набора. Контрольный образец совместим только с набором реагентов МоногенСкрин.

2.4 Время проведения анализа (без учета пробоподготовки): от 2,5 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Предел обнаружения (наименьшая концентрация ДНК, необходимая для анализа заявленных мутаций в гетерозиготном состоянии)

Нижний предел обнаружения – не менее 5,0 нг ДНК человека на амплификационную пробирку, что соответствует $C_p \leq 30,0$ на канале детекции ВК (C_y5). При использовании меньшего количества ДНК ($C_p > 30,0$ на канале детекции ВК) производитель не гарантирует корректную работу набора.

В образцах с недостаточным количеством ДНК (менее 5,0 нг на амплификационную пробирку) после завершения реакции амплификации регистрируется недостоверный результат.

Предел обнаружения в клиническом образце зависит от вида биоматериала, используемого набора (комплекта) реагентов для выделения ДНК и конечного объема элюции (разведения) выделенной ДНК.

5,0 нг ДНК человека на амплификационную пробирку соответствует концентрации ДНК 0,8 нг/мкл.

3.2 Аналитическая специфичность

Интерферирующие вещества в концентрациях: триглицериды – до 36 ммоль/л, гемоглобин – до 26 ммоль/л, билирубин – до 684 мкмоль/л (0,68 ммоль/л), не влияют на специфичность набора реагентов.

3.3 Диагностическая чувствительность и специфичность.

Значения диагностической чувствительности и диагностической специфичности испытываемого медицинского изделия как доля правильно определенных мутантных аллелей (m), обнаруженных среди всего пула аллелей, определяемых испытываемым набором реагентов «МоногенСкрин».

Вид биоматериал, количество образцов	Мутантные аллели	Аллели «дикого типа»	Диагностическая чувствительность, (95% доверительный интервал)	Диагностическая специфичность, (95% доверительный интервал)
Сухие пятна крови, n = 55	58	3242	100 % (93,8 – 100,0)	100 % (99,9- 100,0)
CFTR	26	1624	100 % (98,15 – 100,0)	100 % (99,77-100,0)
PAH	22	1188	100 % (84,56-100,0)	100 % (99,69 -100,0)
GALT	6	324	100 % (54,07 -100,0)	100 % (98,87-100,0)
GJB2	4	106	100 % (39,76 -100,0)	100 % (96,58-100,0)
Периферическая кровь, n = 45	51	2649	100 % (93,0 -100,0)	100 % (99,9 -100,0)
CFTR	24	1326	100 % (85,75 – 100,0)	100 % (99,72 – 100,0)
PAH	21	988	100 % (83,89 – 100,0)	100 % (99,63 – 100,0)
GALT	4	266	100 % (39,76 – 100,0)	100 % (98,62 – 100,0)
GJB2	2	88	100 % (15,81 – 100,0)	100 % (95,90 – 100,0)
Итого n=100	109	5891	100 % (96,6-100,0)	100 % (99,90 – 100,0)
CFTR	50	2950	100 % (92,89-100,0)	100 % (99,88 – 100,0)

PAH	43	2155	100 % (91,78-100,0)	100 % (99,83 – 100,0)
GALT	10	590	100 % (69,15-100,0)	100 % (99,38 – 100,0)
GJB2	6	194	100 % (54,07-100,0)	100 % (98,12 – 100,0)

3.4 Сведения о повторяемости и воспроизводимости, 10 образцов (30 показателей для каждого образца)

Генотип образца*	Количество совпавших результатов исследования			
	Повторяемость (проведение ПЦР в один день, одним оператором, на одном приборе, одна серия набора)		Воспроизводимость (проведение ПЦР в разные дни, на разных приборах, разными операторами, разные серии набора)	
	Генотип образца	Ген.маркеры	Генотип образца	Ген.маркеры
PAH: R408W/PAH: R261Q	3 повтора из 3	180 из 180	4 повтора из 4	240 из 240
PAH: Y414C/PAH: IVS10nt546 G>A	3 повтора из 3	180 из 180	4 повтора из 4	240 из 240
PAH: IVS12+1G>A/PAH:R158Q	3 повтора из 3	180 из 180	4 повтора из 4	240 из 240
PAH: R252W/PAH: D222X	3 повтора из 3	180 из 180	4 повтора из 4	240 из 240
CFTR: 508del/CFTR: G542X	3 повтора из 3	180 из 180	4 повтора из 4	240 из 240
CFTR: 2184insA/CFTR: dele2,3 (21kb)	3 повтора из 3	180 из 180	4 повтора из 4	240 из 240
CFTR: R334W/CFTR: 1677delTA	3 повтора из 3	180 из 180	4 повтора из 4	240 из 240
CFTR: N1303K/CFTR: 2143delT	3 повтора из 3	180 из 180	4 повтора из 4	240 из 240
GALT: Q188R/GALT: N314D	3 повтора из 3	180 из 180	4 повтора из 4	240 из 240
Гетерозигота GJB2: 35delG	3 повтора из 3	180 из 180	4 повтора из 4	240 из 240

* - указаны только выявленные мутации, по остальным показателям определён «дикий тип» (норма)

Межсерийная и внутрисерийная воспроизводимость, 10 образцов (по 30 показателей):

Генотип образца*	Внутрисерийная		Межсерийная	Количество совпадений	
	Набор 1	Набор 2		Генотип образца	Ген.маркеры
CFTR: F508del/-	+	+	+	3 повтора из 3	180 из 180
CFTR: W1282X/-	+	+	+	3 повтора из 3	180 из 180
CFTR: F508del/-	+	+	+	3 повтора из 3	180 из 180
CFTR: 1677delTA/-	+	+	+	3 повтора из 3	180 из 180
PAH: R261Q/-	+	+	+	3 повтора из 3	180 из 180
PAH: R408W/-	+	+	+	3 повтора из 3	180 из 180
PAH: Y414C/-	+	+	+	3 повтора из 3	180 из 180
Мутаций не обнаружено	+	+	+	3 повтора из 3	180 из 180
Мутаций не обнаружено	+	+	+	3 повтора из 3	180 из 180
Мутаций не обнаружено	+	+	+	3 повтора из 3	180 из 180

* - указана только выявленная мутация, по остальным показателям определён «дикий тип» («норма»)

Воспроизводимость между видами биоматериала (ПК – периферическая кровь, СП – сухие пятна, полученные из того же образца крови), 25 образцов (30 показателей в образце)

Генотип образца*	ПК	СП	Генотип образца*	ПК	СП	Генотип образца*	ПК	СП
CFTR: F508del/ CFTR: F508del	+	+	CFTR: 1677delTA/ CFTR: 3821delT	+	+	PAH: R408W/ PAH: R408W	+	+
CFTR: F508del/ CFTR: R334W	+	+	CFTR: F508del/ CFTR: N1303K	+	+	PAH: R252W/ PAH: R252W	+	+
CFTR: dele2,3 (21kb)/ CFTR: dele2,3 (21kb)	+	+	PAH: R261Q/ PAH: R261Q	+	+	PAH: R408W/ PAH: R408W	+	+
CFTR: E92K/ CFTR: E92K	+	+	PAH: R408W / PAH: IVS12+1G>A	+	+	PAH: R261Q/ PAH: R261Q	+	+
CFTR: F508del/ CFTR: 3849+10kbC>T	+	+	PAH: IVS10nt546/ PAH: IVS10nt546	+	+	GALT: Q188R/ GALT: Q188R	+	+
CFTR: F508del/ CFTR: S466X	+	+	PAH: R261Q/ PAH: R261Q	+	+	GALT: N314D/ GALT: Q188R	+	+
CFTR: dele2,3 (21kb)/ CFTR: dele2,3 (21kb)	+	+	PAH: IVS12+1G>A/ PAH: IVS4+5G>T	+	+	GALT: Q188R/ GALT: Q188R	+	+
CFTR: F508del/ CFTR: F508del	+	+	PAH: R261Q/ PAH: D222X	+	+	GJB2: 35delG/ GJB2: 35delG	+	+
CFTR: F508del/ CFTR: F508del	+	+	Количество совпадений: генотип образца – 25 из 25, ген.маркеры – 700 из 700.					

* - указаны только выявленные мутации, по остальным показателям определён «дикий тип» («норма»)

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 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 СП 1.3.2322-08.

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

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

Выделение ДНК следует проводить в боксах микробиологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

Этап ПЦР следует проводить в помещении, снабженном комплектами полуавтоматических или автоматических дозаторов, халатами и прочими принадлежностями. 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 помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 15-30 минут.

Использованные одноразовые принадлежности (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 (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 СП 1.3.2322-08.

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора	Наличие/отсутствие опасных компонентов	Указание на риски
Смеси для амплификации Стрим (16 наименований)	Нет опасных веществ	-
Полимераза ТехноТaq MAX	Нет опасных веществ	-
ПЦР-буфер Стрим	Нет опасных веществ	-
Буфер для разведения ДНК	Нет опасных веществ	-
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1%	является безопасным для конечного пользователя

При использовании по назначению и соблюдению мер предосторожности, контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц, аллергическая реакция. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не допускается использовать набор реагентов:

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

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов МоногенСкрин требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий (ДТпрайм¹ производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- устройство дозирующее «ДТстрим»;
- устройство для запечатывания планшет «ДТпак»;
- центрифуга для микропланшет 384 лунки;
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник или холодильная камера;
- морозильная камера;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл, например, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, или аналогичный;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл, например, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, или аналогичный;
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объем жидкости 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл;
- штатив для дозаторов;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для устройства дозирующего ДТстрим, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл;
- микропланшет 384 лунки;
- полимерная термопленка для запечатывания микропланшет 384 лунки;
- физиологический раствор стерильный;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- дезинфицирующее средство;
- комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуются ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, ПРОБА-ЦИТО СП производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия);
- ini файл с параметрами анализа.

¹ только модели 4X1, 5X1, 6X1.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материалы для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь и сухие пятна крови.

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 инструкциями к комплектам/наборам реагентов для выделения ДНК из соответствующего биологического материала.

6.1.1 Взятие цельной периферической крови

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

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.1.2 Получение сухих пятен крови

Кровь наносится на бумажный носитель в количестве, достаточном для получения пятна диаметром не менее 1 см, при этом кровь должна пропитать бумагу насквозь. После нанесения образца, тест-бланк высушивается в горизонтальном положении на чистой обезжиренной поверхности не менее 2 часов без применения дополнительной тепловой обработки и попадания прямых солнечных лучей.

ВНИМАНИЕ! Во избежание получения неверных результатов нельзя допускать, чтобы кто-либо, кроме исследуемого пациента, прикасался к бумажному бланку без перчаток.

Из центральной части сухого пятна специальным пробойником выбить 3 диска диаметром 3 мм и поместить в микропробирку объемом 1,5 мл

ВНИМАНИЕ! Рекомендуется выбивать диски непосредственно перед процедурой выделения ДНК.

6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала

Допускается транспортирование и хранение образцов:

Цельная периферическая кровь - при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре минус 20 °С в течение одного месяца.

Сухие пятна крови – допустимо до года после просушивания в индивидуальных упаковках в условиях низкой влажности (не более 30%) при температуре от 2 °С до 8 °С. При более длительных сроках хранения образцы сухих пятен крови следует хранить как рекомендует производитель тест-бланков.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

- 7.1 Выделение ДНК из биологического материала
- 7.1.1 Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту/набору реагентов. Для выделения ДНК из биологического материала рекомендуется применение следующих комплектов/наборов реагентов: для получения ДНК из образцов периферической крови - Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в следующей форме комплектации: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА, ООО "НПО ДНК-Технология", Россия, РУ №ФСР 2010/08696 от 25.10.2016, для выделения ДНК из сухих пятен крови - Набор реагентов для выделения ДНК человека из сухих пятен крови (ПРОБА-ЦИТО СП), ООО "ДНК-Технология ТС", Россия или Набор реагентов для выделения ДНК из клинического материала на основе спиртового осаждения («Экстра-ДНК-Био») по ТУ 9398-244-98539446-2012, ООО «Компания Алкор Био», Россия РУ № ФСР 2012/13631 от 29.06.2012.
- 7.1.2 Контроль пригодности выделенной ДНК в ходе ПЦР осуществляется с помощью системы внутреннего контроля (ВК), входящей в состав смесей для амплификации и представляющей собой систему амплификации геномной ДНК человека (см. п.9).

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК из биологического материала одновременно необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор, в объеме, указанном в инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.

- 7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции (вариант с предварительной подготовкой реагентов ручным дозированием – «Базовый способ постановки»)
- 7.2.1 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером Стрим и полимеразой ТехноТaq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

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

- 7.2.2 Приготовьте смесь ПЦР-буфера Стрим и полимеразы ТехноТaq МАХ:
- при проведении 24 определений одновременно (вариант постановки «Микропланшет 384 лунки») – две пробирки с ПЦР-буфером Стрим и две пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ;

- при проведении 12 определений одновременно (вариант постановки «Половина микропланшета 384 лунки») – одну пробирку с ПЦР-буфером Стрим и одну пробирку с полимеразой ТехноТaq МАХ;

внесите в пробирку с ПЦР-буфером Стрим весь объём одной пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ, т.е. 600 мкл ПЦР-буфера Стрим + 60 мкл полимеразы ТехноТaq МАХ.

- 7.2.3 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера Стрим и полимеразы ТехноТaq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Смесью ПЦР-буфера Стрим и полимеразы ТехноТaq МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием, хранение смеси не допускается.

- 7.2.4 Аккуратно, без образования воздушных пузырей, внесите в восемь пробирок пустого стрипа по 140 мкл смеси ПЦР-буфера Стрим и полимеразы ТехноТaq МАХ при постановке 24 определений одновременно (вариант постановки «Микропланшет 384 лунки»), или по 75 мкл смеси ПЦР-буфера Стрим и полимеразы ТехноТaq МАХ при постановке 12 определений одновременно (вариант постановки «Половина микропланшета 384 лунки»). Закройте крышку стрипа.

- 7.2.5 Центрифугируйте стрип в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

- 7.2.6 Промаркируйте три пустых стрипа, из состава набора, при постановке 24 определений одновременно (вариант постановки «Микропланшет 384 лунки»), или два пустых стрипа при постановке 12 определений одновременно (вариант постановки «Половина микропланшета 384 лунки»).

- 7.2.7 Встряхните пробирки с буфером для разведения ДНК в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

- 7.2.8 Внесите в каждую пробирку промаркированных стрипов по 100 мкл буфера для разведения ДНК.

- 7.2.9 Встряхните пробирки с полученными препаратами ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при 16 000 x g в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

Относительное ускорение центрифуги (RCF или g) зависит от частоты вращения и радиуса центрифугирования. Для определения соответствия центрифуги заданным параметрам центрифугирования обратитесь к руководству по эксплуатации.

- 7.2.10 Аккуратно, без образования воздушных пузырей, внесите в соответствующие пробирки стрипов с буфером для разведения ДНК по 40 мкл препарата ДНК исследуемых образцов, отрицательного контрольного образца и положительного контрольного образца.

ВНИМАНИЕ! Во избежание контаминации рекомендуется вносить препараты ДНК и положительный контрольный образец наконечниками с фильтром.

- 7.2.11 Центрифугируйте двойной стрип со смесями для амплификации Стрим в течение 1-3 с на микроцентрифуге- вортексе.

ВНИМАНИЕ! При первой постановке «Половина микропланшета 384 лунки» после раскапывания необходимо плотно закрыть двойной стрип со смесями для амплификации Стрим вложенными в набор крышками и хранить до второй постановки при температуре от 2 °С до 8 °С. После вскрытия двойной стрип со смесями для амплификации Стрим необходимо использовать в течение одной недели.

- 7.2.12 Установить двойной стрип со смесями для амплификации Стрим, стрипы со смесью ПЦР-буфера Стрим и полимеразы ТехноТaq МАХ, с разведенными образцами, «К-» и «К+», а также пустые стрипы и микропланшет 384 лунки на рабочий стол ДТстрим.

- 7.2.13 Откройте двойной стрип со смесями для амплификации Стрим, аккуратно сняв защитную пленку или открыв крышки, и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

- 7.2.14 Поместите аккуратно, не встряхивая микропланшет 384 лунки в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.

- 7.2.15 Проведите процедуру запечатывания микропланшет 384 лунки термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

- 7.2.16 Центрифугируйте микропланшет 384 лунки при 500 x g в течение 30 с.

- 7.2.17 Поместите микропланшет 384 лунки в детектирующий амплификатор.

- 7.2.18 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «Monogenic_diseases.ini». При последующих постановках выберите «Мультитест», добавьте в протокол тест «Monogenic_diseases», укажите идентификаторы образцов, в том числе положительного и отрицательного контрольных образцов, и проведите ПЦР. При

выборе тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 2.

Таблица 2 – Программа амплификации для детектирующего амплификатора ДТпрайм

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Δt , °C	Тип блока
1	80	2	00	1			Цикл
	94	5	00				
2	94	0	30	5			Цикл
	67	0	15		√		
3	94	0	5	45			Цикл
	67	0	15		√		
4	25	0	30	1			Цикл
5*	25	0	20	50	√	1,0	«Кривая плавления», $\Delta t=1\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{кон}}=75\text{ }^{\circ}\text{C}$
6	10	...	...	хранение			хранение
* При создании блока 5 отметить тип "Кривая плавления."							

7.3 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции (вариант с предварительной подготовкой реагентов на дозирующем устройстве ДТстрим – «Интегрированный способ постановки»)

7.3.1 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером Стрим, буфером для разведения ДНК и полимеразой ТехноТaq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе. Для проведения 24 определений одновременно (вариант постановки «Микропланшет 384 лунки») используется две пробирки с ПЦР-буфером Стрим, четыре пробирки с буфером для разведения ДНК и две пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ. Для проведения 12 определений одновременно (вариант постановки «Половина микроплшета 384 лунки») используется одна пробирка с ПЦР-буфером Стрим, две пробирки с буфером для разведения ДНК и одна пробирка с полимеразой ТехноТaq МАХ.

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

7.3.2 Центрифугируйте двойной стрип со смесями для амплификации Стрим в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.3 Встряхните пробирки с полученными препаратами ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом в течение 3-5 с и

центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе. Установите пробирки на рабочий стол ДТстрим в штатив для образцов ДНК в соответствии с протоколом ЛИС.

ВНИМАНИЕ! При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при 16 000 x g в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

Относительное ускорение центрифуги (RCF или g) зависит от частоты вращения и радиуса центрифугирования. Для определения соответствия центрифуги заданным параметрам центрифугирования обратитесь к руководству по эксплуатации.

- 7.3.4 Установите двойной стрип со смесями для амплификации Стрим, пробирки с ПЦР-буфером Стрим, буфером для разведения ДНК и полимеразой ТехноТaq МАХ, а также пустые стрипы, микропланшет ПЦР (384 лунки) на рабочий стол ДТстрим.
- 7.3.5 Откройте двойной стрип со смесями для амплификации Стрим, аккуратно сняв защитную пленку или открыв крышки, и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

ВНИМАНИЕ! При первой постановке «Половина микропланшета 384 лунки» после раскапывания необходимо плотно закрыть двойной стрип со смесями для амплификации Стрим вложенными в набор крышками и хранить до второй постановки при температуре от 2 °С до 8 °С. После вскрытия двойной стрип со смесями для амплификации Стрим необходимо использовать в течение одной недели.

- 7.3.6 Поместите аккуратно, не встряхивая микропланшет 384 лунки в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
- 7.3.7 Проведите процедуру запечатывания микропланшет 384 лунки термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.
- 7.3.8 Центрифугируйте микропланшет 384 лунки при 500 x g в течение 30 с.
- 7.3.9 Поместите микропланшет 384 лунки в детектирующий амплификатор.
- 7.3.10 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «Monogenic_diseases.ini». Заполните протокол согласно инструкции к ЛИС. При выборе тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 2.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

- 8.1 Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.
- 8.2 На графике будет отображена зависимость флуоресценции от температуры плавления для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, название выявляемой мутации и результат генотипирования каждого образца. По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчет.
- 8.3 В бланке ответа указываются генотипы образца с краткой характеристикой и заключением по результатам генотипирования.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

- 9.1 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.
- 9.2 Для всех образцов программа фиксирует результат амплификации геномной ДНК человека (ВК). Результат считается достоверным, если значение C_p для ВК составляет $\leq 30,0$.
- 9.3 В образцах, прошедших ПЦР, для которых значение C_p для ВК составляет $\leq 30,0$, программа определяет генотип исследуемого образца, который отображен в таблице в графе «Полиморфизм».

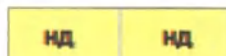
ВНИМАНИЕ! В связи с высокой социальной и медицинской значимостью носительства мутации в исследуемых генах (CFTR, PAH, GALT и GJB2), в случае получения гетерозиготного или гомозиготного по мутации генотипа для достоверности рекомендуется повторить исследование из того же препарата ДНК.

- 9.4 В положительном контрольном образце должен быть определён соответствующий генотип (см. приложение А):

Положительный контрольный образец [гомозиготный по нормальному аллелю] –



- 9.5 Для образцов с недостаточным для анализа количеством ДНК (менее 5,0 нг на амплификационную пробирку, $C_p > 30,0$ на канале детекции ВК), программа определяет недостоверный результат:



В случае получения недостоверного результата требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

9.6 Для образцов с достаточным для анализа количеством ДНК ($C_p \leq 30,0$) программа может определять сомнительный результат (

?	?
---	---

) согласно следующим параметрам анализа полиморфизмов:

- «Анализ по температурным пикам» – температура плавления продуктов ПЦР отличается от заданной более, чем на $3,0\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- «Разностный анализ» – разница между заданной и полученной температурами плавления по каналам Fam и Hex в пределах одного генотипа, или по каналам Rox и Cy5 в пределах одного генотипа составляет более $2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- «Нижний порог температурного пика» – температурный пик (dF/dT) $< 5,0$.

Для таких образцов требуется повторное проведение ПЦР.

9.7 Для отрицательных контрольных образцов программа фиксирует недостоверный результат:

нд	нд
----	----

9.8 При получении положительного значения (определение генотипа) в отрицательном контрольном образце результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

- 10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов, входящих в состав набора.
- 10.1.2 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq МАХ при температуре от 2 °С до 8 °С не более 5 суток.
- 10.1.3 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

- 10.2.1 Компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора.
- 10.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.
- 10.2.3 Смеси для амплификации Стрим следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.2.4 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

- 10.3.1 Набор должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.
- 10.3.2 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:
- компоненты набора следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора;
 - смеси для амплификации Стрим следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение одной недели;
 - полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.
- 10.3.3 Наборы с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 11.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684 и МУ 1.3.2569.
- 11.2 Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 12.2 Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

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

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Только для диагностики in vitro		Дата производства
	Температурный диапазон		Содержит инструкцию по применению
	Количество определений		Каталожный номер
	Годен до		Адрес производителя
	Серия набора		Не допускается воздействие солнечного света

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

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

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

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики 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 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований, Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

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

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

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 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.

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

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

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

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС», ООО «ДНК-Технология ТС» (Общество с ограниченной ответственностью), 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 МоногенСкрин, следует обращаться по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, к.б., этаж 5, ком. 14, тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru

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

Заместитель ген. директора по науке

ООО «НПФ ДНК-Технология»

к.б.н



Д.Д.Абрамов

«13» 04 2021 г.

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ «НМИЦ АГП
Им. В.И. Кулакова» Минздрава России
Академик РАН, профессор



Г.Т. Сухих

«13» 04 2021 г.

Приложение А
(обязательное)

Таблица А.1 – Положительный контрольный образец к набору реагентов МоногенСкрин

Контрольный образец	Контролируемая смесь для амплификации	Ожидаемый результат генотипирования
Положительный контрольный образец	CFTR: 3944delGT CFTR: F508del GALT: K285N CFTR: N1303K CFTR: 1677delTA CFTR: 3849+10kbC>T PAH: IVS10nt546 CFTR: W1282X PAH: R261Q CFTR: E92K PAH: E280K PAH: R408W PAH: P281L CFTR:G542X PAH: IVS12+1G>A PAH: Y414C PAH: IVS4+5G>T PAH: R158Q CFTR: 2143delT CFTR: R334W PAH: R252W CFTR: 394delTT CFTR: 2184insA CFTR: 3821delT CFTR: S466X GALT: N314D GJB2: 35delG CFTR: dele2,3 (21kb) PAH: D222X GALT: Q188R	N / N
	БК	+



Пронумеровано, прошито и
скреплено печатью на 29^{ов}
двадцать девять листах

Е.А. Городникова
Зав. центром научных
исследований
департамента организации
научной деятельности
ФГБУ "ИНИИЗ НГП им. В.И. Куликова"