



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «ИИ «БЛЮТОЛ»»

Тюмин. И.В.

2022г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

Набора реагентов для определения уровня фрагментации ДНК
сперматозоидов человека «Блютол»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения уровня фрагментации ДНК сперматозоидов человека «Блютол» предназначен для полуколичественного определения уровня фрагментации ДНК сперматозоидов человека методом световой микроскопии для диагностики качества спермы и оценки фертильности и сперматогенеза.

Функциональное назначение: вспомогательное средство в in vitro диагностике.

Популяционные и демографические аспекты. Изделие применимо для оценки качества спермы мужчин фертильного возраста.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики in vitro.

Показания и противопоказания к применению изделия

Изделие предназначено для исследования образцов спермы при:

-нарушении фертильности мужчин,

-бесплодии пары и/или привычных выкидышах в естественном репродуктивном цикле,

-неудачи процедур вспомогательных репродуктивных технологий.

Противопоказаний не существует.

Потенциальные потребители изделия

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности.

Целевым анализом является хроматин головки сперматозоида. В ходе исследования цитохимическим окрашиванием устанавливается качественная характеристика – наличие или отсутствие головок сперматозоидов с нарушенной структурой хроматина. Доля нормальных и поврежденных головок сперматозоидов рассматривается как индекс фрагментации ДНК (DFI).

Целостность хроматина головки сперматозоидов важный фактор, влияющий на функциональную компетентность сперматозоидов. Обнаружение повреждения хроматина головки сперматозоидов может быть клинически полезным как часть обследования фертильности.

DFI более 30%, коррелирует с более низким показателем успешности естественной беременности, внутриматочной инсеминации и экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), а также более высокой частотой выкидышей.

Результаты тестирования не должны использоваться в качестве единственного основания для подтверждения или исключения нарушения структуры хроматина головки

Введена впервые

с. 1

сперматозоида. Проведение тестирования на фрагментацию ДНК сперматозоидов необходимо в случае если первичная диагностика фертильности не прояснили причины отсутствия беременности, мужчине назначают тест на фрагментацию ДНК спермы - позволяющий выявить процент сперматозоидов с неповрежденной и поврежденной ДНК. Опытным путем показано, что увеличение содержания сперматозоидов с фрагментированной ДНК приводит к отсутствию беременности, произвольному прерыванию беременности.

Тест основан на анализе специфически обработанных и прокрашенных головок сперматозоидов с использованием световой микроскопии. По результатам исследований врач может назначить дополнительную терапию, влияющую на качество фертильности и сперматогенеза.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Набор выпускается в одном базовом варианте комплектации

Название компонента	Описание	Кол-во
Раствор № 1 (гидролизующий раствор)	0,1 Н раствор хлористоводородной кислоты Прозрачная бесцветная жидкость без механических включений	1 фл. (100 мл)
Раствор № 2 (буфер красителя)	Цитратно-фосфатный буферный раствор Макилвейна (рН 3,5) Прозрачная бесцветная жидкость без механических включений	1 фл. (50 мл)
Раствор № 3 (глицерин)	Прозрачная бесцветная жидкость без механических включений	1 фл. (50 мл)
Раствор № 4 (краситель)	1 % раствор Толуидиновый синий О Непрозрачная жидкость синего цвета, допускается наличие небольшого осадка	1 фл. (6 мл)
Стекло предметное		10 шт.
Инструкция		1 шт

Примечания. 1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки анализа кроме, дистиллированной воды, этанола 96 %, фосфатного буферного раствора рН 7,2

2. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

3. В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант позволяет провести исследование 10 образцов

Методы стерилизации изделия

Изделие не требует стерилизации.

Программное обеспечение работы изделия

Отсутствует.

Техническое обслуживание и ремонт изделия

Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Фосфатные группы ДНК сперматозоидов в ядрах с нарушением целостности ДНК склонны к связыванию с основными красителями такими, как О толуидиновый синий. При световой микроскопии сперматозоиды с поврежденной ДНК окрашены в темнофиолетовый цвет, а сперматозоиды без повреждений бледно-голубой. Полуколичественная мера оценки анализа, которую обозначают как индекс фрагментации ДНК, представляет собой отношение количества сперматозоидов с поврежденной ДНК к общему количеству сперматозоидов.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Набор реагентов «Блютол» должен выявлять DFI (индекс фрагментации ДНК) $> 30\%$ во всех образцах с высоким индексом фрагментации ДНК и DFI интервале $15 - 30\%$ в образцах со средним индексом фрагментации ДНК стандартной панели предприятия (СПП) (чувствительность – 100%), и не давать ложноположительных результатов ($DFI > 15\%$) при исследовании образцов той же стандартной панели, с низким индексом фрагментации ДНК (специфичность – 100%).

Индекс фрагментации ДНК, определенный с помощью набора в образцах СПП с известным уровнем фрагментации ДНК, не должен отличаться от паспортного значения более чем на 10% .

Диагностические характеристики.

Диагностическая чувствительность набора реагентов: $98,51\% - 100\%$ (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность набора реагентов: $98,51\% - 100\%$ (с доверительной вероятностью 95%).

Воспроизводимость результатов составляет 100% .

Потенциально интерферирующие вещества эритроциты, лейкоциты, клетки сперматогенеза, эпителия не оказывают влияния на результат анализа.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Исследование проводится на нативных образцах спермы (эякулят).

Минимальный объём эякулята для анализа 500 мкл, минимальная допустимая концентрация сперматозоидов не менее $5 \times 10^6/\text{мл}$.

Исходная концентрация сперматозоидов подсчитывается в камере, предназначенной для определения количества и параметров подвижности сперматозоидов.

Получение рабочей концентрации сперматозоидов (около 20×10^6 клеток/мл) проводят путем осаждения центрифугированием в фосфатном буферном растворе pH 7,2, при необходимости разбавляют до нужной концентрации добавлением свежего фосфатного буферного раствора pH 7,2.

Образцы спермы допускается хранить при $+4^{\circ}\text{C}$ не более суток, при -20°C не более недели. Допускается только однократное размораживание.

Эякулят, собирают путем мастурбации в стерильный пластиковый контейнер после 3-5 дней полового воздержания. Накануне необходимо исключить прием алкоголя, лекарственных препаратов (по согласованию с врачом), посещение бани/сауны, желателно исключить тяжелые физические и психологические нагрузки.

Обращаться со всеми образцами необходимо, как с потенциально инфицированными.

Следует принимать необходимые меры защиты, чтобы избежать прямого контакта с образцами. В случае случайного контакта необходимо своевременно провести дезинфекционную обработку и принять соответствующие меры.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

Меры предосторожности при работе с наборами реагентов «Блютол» – это соблюдение правил "Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений" (Утв. Мин здравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003).

Работу с набором осуществляют в защитных очках и перчатках. При работе с компонентами набора следует не допускать попадания реагентов на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженное место большим количеством проточной воды. При проглатывании следует обратиться за медицинской помощью.

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом, строго выполняя требования безопасности при исследованиях материалов, потенциально инфицированных возбудителями II групп патогенности (ВИЧ, гепатиты) СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

Набор реагентов, в соответствии с СанПиНом 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" относится к классу Б (эпидемиологически опасные отходы) - инфицированные и потенциально инфицированные отходы, материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с 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" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

Для реагентов с истекшим сроком годности также допустим метод термической утилизации и уничтожения при температуре 100°C.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы (не входят в набор)

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема) с погрешностью дозирования не более 5 %;

Наконечники полипропиленовые одноразовые для дозаторов пипеточных;

Световой микроскоп с увеличением x1000 (Иммерсия);

Камера для подсчета клеток.

Счетчик лабораторный для подсчета клеток.

Центрифуга лабораторная;

Этанол 96 %;
Фосфатный буферный раствор pH 7,2
Дистиллированная вода;
Лоток для окрашивания.
Холодильник бытовой
Чашки Петри

Подготовка к анализу.

Перед проведением анализа, при хранении набора при температуре от +5 до +18⁰С, все компоненты набора выдержать при комнатной температуре.

Подготовка исследуемого образца

Для получения более точных результатов срок между получением и анализом образца следует свести к минимуму, однако, допускается более длительное хранение эякулята (см. раздел «Исследуемые образцы»).

Свежий эякулят разжижают при 37⁰С в течение 30 мин.

Разжиженный эякулят промывают фосфатно-солевым буфером (pH 7,2) и центрифугируют при 800g в течение 10 мин.

Повторно суспендируют осадок в фосфатно-солевом буфере и доводят до приблизительной концентрации 20×10^6 клеток/мл.

Делают тонкий мазок на предметное стекло (входит в состав набора), а затем сушат на воздухе в течение 30 минут. Предметное стекло до нанесения исследуемого образца не требует дополнительной обработки.

Высохший мазок фиксируют (спирт 96%) инкубируя в течение 30 минут, а затем сушат на воздухе до высыхания образца.

Фиксированные препараты можно хранить до окрашивания в темноте при комнатной температуре, не влияя на результаты в течение недели.

Приготовление буферного раствора красителя

Смешать 0.5 мл красителя (Раствор №4) с 4,75 мл буфера красителя (Раствор №2) и добавить 4,75 мл глицерина (Раствор №3). Тщательно перемешать полученный буферный раствор.

Приготовление реагентов

Раствор № 1 (гидролизующий раствор) готов к применению, охлаждают до +4⁰С в холодильнике перед проведением анализа.

Проведение анализа.

Предметное стекло с образцом погружают в охлажденный гидролизующий раствор (Раствор №1), используя чашку Петри для одного стекла, инкубируют при +4⁰С в течение 5 мин. После этого предметное стекло погружают 3-кратно в течение 2 минут в дистиллированную воду и высушивают.

Приготовленный буферный раствор красителя наносят на Предметное стекло с образцом, равномерно распределяя раствор красителя по всей поверхности препарата, и выдерживают 10 минут при комнатной температуре.

Далее стекло с окрашенным образцом кратковременно ополаскивают в дистиллированной воде и сушат на воздухе.

Регистрация и учет результатов

На световом микроскопе с увеличением $\times 1000$ (иммерсия) подсчитывают в общей сложности 200-300 сперматозоидов в разных полях зрения.

Проводят отдельный подсчет сперматозоидов с фрагментированной ДНК (сперматозоиды с фрагментированной ДНК окрашиваются в фиолетовый, темно-фиолетовый цвета) и нормальные сперматозоиды (окрашиваются в светло-голубой цвет).

DFI (индекс фрагментации ДНК) рассчитывается по формуле:

$$DFI = [Y / S] \times 100, \text{ где}$$

общее количество сперматозоидов ($S = X + Y$), количество сперматозоидов с не фрагментированной ДНК (X), количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК (Y).

Интерпретация результата:

При значении $DFI < 15\%$ (низкий DFI) регистрируется норма

При значении DFI в интервале $15 - 30\%$: (средний DFI) регистрируется средняя степень фрагментации ДНК

При значении $DFI > 30\%$: (высокий DFI) регистрируется высокая степень фрагментации ДНК, ассоциированная с мужской репродуктивной дисфункцией.

Ограничения при применении набора

1. Набор реагентов «Блютол» используют только для определения уровня фрагментации ДНК сперматозоидов человека в испытуемом образце

2. Результаты теста, проведенного с помощью набора реагентов «Блютол» не должны рассматриваться в качестве единственного критерия, должны быть всесторонне оценены врачом в сочетании с результатами других методов исследования фертильности, с анамнезом и клинической картиной.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Замораживание не допускается.

Хранение наборов должно осуществляться при температуре от $+5$ до $+25^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от $+2$ до $+8^{\circ}\text{C}$ до истечения срока годности, при температуре от $+5$ до $+25^{\circ}\text{C}$ течение 5 дней.

Транспортирование

Замораживание не допускается.

Следует перевозить в оригинальной упаковке производителя, защищающей продукцию от внешних воздействий, на всех видах транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида при температуре от $+5^{\circ}\text{C}$ до $+25^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

При проведении погрузочно-разгрузочных работ и транспортировании следует строго выполнять требования манипуляционных знаков, нанесенных на упаковке и транспортной таре.

Важно: При несоблюдении условий транспортирования и хранения медицинское изделие не подлежит использованию.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов для определения уровня фрагментации ДНК сперматозоидов человека «Блютол» соответствует ТУ 20.59.52-001-06227762-2021, Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу производства набора реагентов:

443001, Россия, г. Самара, ул. Чкалова, д. 72, кв. 66. ООО "ИНБИО ЛАБ", nbio@bk.ru

Генеральный директор ООО "ХалоРУС "

И.В. Виноградов

" " 2021 г.

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

П.К. Варнавичус

" " 2021 г.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА УПАКОВКЕ И ЭТИКЕТКАХ

	Дата изготовления Примечание - Настоящий символ сопровождается указанием даты изготовления изделия: может представлять собой год, год и месяц или год, месяц и день, если целесообразно
	Беречь от влаги Примечание - Настоящий символ может также означать "Сохранять в сухом состоянии" (см. ИСО 7000:1989)
	Использовать до ... Примечание - Настоящий символ сопровождается датой, указывающей, что изделие рекомендуется использовать до истечения установленного срока; дата может представлять собой год, год и месяц или год, месяц и день, если целесообразно
	Температурный диапазон Примечание - Верхнюю и нижнюю границы температурного диапазона рекомендуется указывать рядом с верхней и нижней горизонтальными линиями
	Код партии Примечание - Настоящий символ сопровождается указанием кода партии, соответствующего маркированному изделию
	Номер по каталогу Примечание - Настоящий символ сопровождается указанием номера изделия, маркированного данным символом, в каталоге
	Изделие медицинское для диагностики in vitro Примечание - Настоящий символ рекомендуется использовать для идентификации только медицинских изделий при диагностике in vitro, но не изделий, предназначенных для применения в лабораторных условиях

Прошито, пронумеровано и скреплено
печатью 4 (четыре) листов
Должность Генеральный директор
ООО „Индио Лаб“
Подпись [подпись] / [подпись]
« 07 » марта 2022 года М.П.

