

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Геном-Микс»

Д.Н. Дейниченко

«19» 2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО РАБОТЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

«Genome-X SMA/TREC/KREC testing kit. Набор реагентов для выявления гомо- и гетерозиготных делеций в гене SMN1, отвечающего за развитие спинальной мышечной атрофии, и внехромосомных кольцевых ДНК как биомаркеров первичных иммунодефицитов»

VER 19.04.2023

IVD

Настоящая инструкция по работе распространяется на медицинское изделие для диагностики *in vitro* (МИ ИВД) – «Genome-X SMA/TREC/KREC testing kit. Набор реагентов для выявления гомо- и гетерозиготных делеций в гене SMN1, отвечающих за развитие спинальной мышечной атрофии, и внехромосомных кольцевых ДНК как биомаркеров первичных иммунодефицитов» (далее по тексту – Набор реагентов).

Набор реагентов изготовлен в соответствии с ТУ 21.20.23-001-71944992-2022.

Сокращенное наименование набора реагентов: «Genome-X SMA/TREC/KREC testing kit».

ВНИМАНИЕ: перед применением «Genome-X SMA/TREC/KREC testing kit» внимательно прочитайте настоящую инструкцию!

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция в реальном времени
МАНК	методы амплификации нуклеиновых кислот
НК	нуклеиновая кислота
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
СМА	спинальная мышечная атрофия
ПИД	первичные иммунодефициты
МИ	медицинское изделие
МИ ИВД	медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
МР	методические рекомендации
ПБА	патогенные биологические агенты

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления делеций 7 экзона в гене SMN1 в гомо- и гетерозиготном состоянии (носительство) и количественного определения наличия внехромосомных кольцевых ДНК-молекул TREC (эксцизионных колец Т-клеточного рецептора) и KREC (рекомбинационные кольца каппа-делеционного элемента) в целях проведения неонатального и селективного скрининга на спинальную мышечную атрофию и первичные иммунодефициты в биологическом материале человека (пятнах сухой крови на фильтр картах) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Целевой анализ: делеции 7 экзона в гене SMN1 в гомо- и гетерозиготном состоянии и внехромосомные кольцевые ДНК-молекулы TREC и KREC.

Исследуемый материал: материалом для исследования набором реагентов являются смывы сухих пятен крови с фильтр-карт.

Функциональное назначение: неонатальный и селективный скрининг спинальной мышечной атрофии и первичных иммунодефицитных состояний.

Потенциальный пользователь: персонал, с высшим и средним медицинским образованием, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.

Область применения: клиническая лабораторная диагностика, лабораторная генетика.

Показания к применению:

- прямой молекулярно-генетический скрининг спинальной мышечной атрофии - определение количества копий гена SMN1 у новорожденных, детей с симптомами СМА и лиц репродуктивного возраста (при планировании беременности).

- прямой молекулярно-генетический скрининг первичных иммунодефицитов, связанных с изменением уровня содержания эксцизионных колец Т-клеточного рецептора (TREC) и(или) рекомбинационных колец каппа-делеционного элемента (KREC) у новорожденных при проведении неонатального скрининга и селективного скрининга у детей.

Противопоказания к применению: набор реагентов «Genome-X SMA/TREC/KREC testing kit», в рамках установленного производителем назначения, противопоказаний не имеет.

Набор реагентов не подлежит использованию в случаях:

- нарушенной внутренней упаковки и/или не соответствующего описанию внешнего вида;
- несоблюдения условий транспортирования и/или хранения согласно инструкции;
- истекшего срока годности.

Количество определений: Набор реагентов рассчитан на исследование 100 образцов ДНК, включая образцы ДНК, входящие в набор (48 проб крови (смывы сухих пятен крови с фильтр-карт)). Количество контрольных материалов, входящих в набор реагентов, рассчитаны на проведение анализов в 6 постановках (при необходимости).

Сведения об определяемой патологии:

Спинальная мышечная атрофия (СМА) – это аутосомно-рецессивное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся дегенерацией, альфа-моторных нейронов в передних рогах спинного мозга. СМА является одной из самых тяжелых наследственных болезней, приводящих в большинстве случаев к летальному исходу. Частота встречаемости заболевания 1 на 6500-8000 новорожденных, частота носительства 1 на 40-50 человек (Markowitz et al., 2012). СМА подразделяется на I, II, III и IV тип на основе возраста начала развития симптомов и тяжести заболевания (Zerres et al., 1997). Развитие всех форм СМА вызвано мутациями в гене выживания моторных нейронов SMN1. 95% пациентов имеют гомозиготную делецию 7 экзона гена SMN1, в то время как у остальных индивидуумов, страдающих заболеванием и сохранивших хотя бы одну копию гена SMN1, были обнаружены внутригенные мутации (Lefebvre et al., 1995; Wirth et al., 2000).

Ген SMN1 имеет центромерно ориентированную копию – ген SMN2, количество которого, как было показано, может варьировать от 0 до 8, и коррелирует с тяжестью СМА (Mailman et al., 2002). Ген SMN2 не способен полностью компенсировать отсутствие гена SMN1 из-за одонуклеотидной замены в 7-м экзоне, что приводит в процессе альтернативного сплайсинга к

формированию мРНК гена SMN2, лишенной 7 экзона, снижению количества полноразмерной мРНК гена SMN2 и, соответственно, образованию нестабильного, неполноразмерного белка SMN (Monanietal., 1999).

В будущем клеточная терапия может стать одним из основных путей лечения СМА, применяемой на стадии после выявления симптоматики, на сегодняшний день ключевое значение для эффективности пресимптоматического лечения имеет раннее выявление больных.

Первичные иммунодефициты (ПИД), тяжелый комбинированный иммунодефицит и X-сцепленная агаммаглобулинемия, характеризуются отсутствием функциональных Т и В-лимфоцитов соответственно. Без своевременной ранней диагностики и лечения дети с ПИД страдают от инфекционных заболеваний с тяжелым течением, что приводит к их инвалидизации или смерти. Диагностика ПИД проводится путем определения уровня внехромосомных кольцевых молекул ДНК, являющихся универсальными маркерами Т-клеточных иммунодефицитов - TREC (T-cell receptor excision circle) и В-клеточных иммунодефицитов - KREC (kappa-deleting recombination excision circle) (Serana et al., 2013). Количество TREC и KREC может быть оценено с помощью количественной ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и, ввиду прямого маркирования зрелых наивных Т и В-лимфоцитов, имеет высокий диагностический потенциал (Borte et al., 2012). Количественный анализ TREC активно применяется для оценки функции тимуса и неогенеза Т-клеток. Он был использован для диагностики иммунодефицитов, для неонатального скрининга ПИД у новорожденных, и как предиктор восстановления Т-клеточной функции после пересадки костного мозга. В целом, низкие уровни TREC и KREC в крови новорожденных указывают на Т- и/или В-клеточную лимфопению, что позволяет применять определение уровней TREC и KREC для ранней диагностики ПИД (King and Hammarström, 2018).

Классификация медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Класс потенциального риска применения медицинского изделия для диагностики *in vitro* в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утвержденной приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06 июня 2012 г. № 4н – 26.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

2.1 Состав набора реагентов:

- I. Инструкция по работе с набором реагентов – 1 шт.;
- II. Коробка № 1 («Genome-X SMA/TREC/KREC testing kit») в составе:
 - 1) Паспорт Качества;
 - 2) 100X раствор для элюции – 300 мкл, 1 пробирка;
 - 3) MasterMix – 3700 мкл (2 пробирки по 1850 мкл);
 - 4) Полимераза – 85 мкл, 1 пробирка;
- III. Коробка №2 («Genome-X SMA/TREC/KREC testing kit» набор контролей») в составе:
 - 1) ДНК SMN1 del/del - 20 мкл, 1 пробирка;
 - 2) ДНК SMN1 +/-del - 20 мкл, 1 пробирка;
 - 3) ДНК SMN1 +/-+ - 20 мкл, 1 пробирка.
 - 4) Паспорт Качества.

2.2 Комплектность

Набор реагентов выпускается в одном варианте комплектации, совпадающей с составом набора реагентов.

2.3 Принцип метода

В основе работы набора реагентов лежит быстрая элюция ДНК из сухих пятен крови и последующая постановка ПЦР в реальном времени. Элюция ДНК происходит из кружка сухого пятна крови, полученного с помощью пинцета с фильтр-карт. После проведения промывок кружка, полученного с фильтр карты, а затем его нагревания в растворе для элюции происходит

очистка и вымывание геномной ДНК с фильтра. На следующем этапе происходит ПЦР-амплификация полученных образцов ДНК в режиме реального времени. Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров, комплементарных специфическому участку ДНК, и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров ферментом Taq-полимеразой. В основе получаемых результатов лежит метод относительного количественного анализа или метод $\Delta\Delta C_t$. Для осуществления этого метода в ПЦР-смеси присутствуют праймеры и зонды к гену SMN1, сигнал которого детектируется по каналу FAM, праймеры и зонды к референсному гену, сигнал которого детектируется по каналу ROX, а также праймеры и зонды к кольцевым ДНК-элементам TREC и KREC, сигналы которых детектируются по каналам HEX и Cy5, соответственно. Детекция сигнала осуществляется за счет присутствия флуоресцентных меток, а также гасителей на обоих зондах. Пока зонды находятся в смеси в свободном виде, флуоресцентная метка блокируется гасителем флуоресценции, тогда как в случае специфичного связывания зонда с ДНК-мишенью зонд разрушается на стадии элонгации за счет 5'-3' активности полимеразы, 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 и измеряется на каждом цикле амплификации. Набор реагентов ООО «Геном-Микс» позволяет проводить количественную оценку уровня флуоресценции, на основе чего можно делать выводы о наличии делеций в гене SMN1 или количестве его копий в геноме. При обработке результатов ПЦР-PB количество копий гена интереса определяется на основе концентрации продукта ПЦР-PB с этого гена по отношению к концентрации продукта ПЦР-PB с референсного гена, который присутствует в геноме в 2 копиях. Контроли для анализа ПИД не предоставляются. Количественное содержание молекул TREC и KREC осуществляется по формуле, указанной в п. 10.2. Известно, что уровень TREC и KREC у взрослых людей снижается до уровня, сопоставимого с уровнем данных молекул у больных ПИД. Образец ДНК здорового младенца в возрасте до 1 года содержит максимальное количество молекул TREC и KREC (Kwok et al., 2020).

Постановка ПЦР-PB осуществляется на приборах: ДТпрайм (ДНК-Технология, Россия; ФСР 2011/10229), QuantStudio5 (Thermofisher, США; РЗН 2019/8446).

2.4 Описание «Genome-X SMA/TREC/KREC testing kit»

Реагенты, входящие в состав набора реагентов	Внешний вид	Состав
100X раствор для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	элюэнт, вода
MasterMix	Прозрачная жидкость без осадка от светло розового до фиолетового цвета	ДНК-олигонуклеотиды, Нуклеозидтрифосфаты, MgCl ₂ , буфер
Полимераза	Прозрачная жидкость без осадка	Taq-полимераза
ДНК SMN1 del/del	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	ДНК человека с гомозиготной делецией, буфер
ДНК SMN1 +/-del	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	ДНК человека с гетерозиготной делецией, буфер
ДНК SMN1 +/-	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	ДНК здорового человека, буфер
Состав набора реагентов указан с учетом п.6.1.3 ГОСТ Р 51088-2013 (без раскрытия коммерческой тайны)		

При изготовлении набора реагентов используется материал человеческого происхождения,

а именно: ДНК. Материал не токсичен, не ядовит и не входит в непосредственный контакт с организмом человека. Не являются фармакологической субстанцией или лекарственным препаратом. Процессы переработки, консервации, тестирования и обработки тканей, клеток и веществ человеческого происхождения выполнены таким образом, чтобы обеспечить максимальный уровень биологической безопасности для пользователей, пациентов и других людей. Материалы человеческого происхождения, применяемые при изготовлении набора реагентов, получены от людей, прошедших медицинский осмотр и находившихся под наблюдением, с учетом предполагаемого использования этого материала.

2.5 Стабильность набора реагентов

Стабильность набора реагентов при хранении 12 месяцев*

Примечание стабильность набора реагентов при хранении была проверена методом ускоренной проверки стабильности. По истечении сроков хранения образцов, заложенных на проверку срока стабильности, заявленный срок хранения может быть уточнен.

Стабильность набора реагентов после вскрытия: 12 месяцев

3 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая Чувствительность

100% чувствительность в выявлении делеций 7 экзона гена *SMN1* (не детектируются точечные мутации в гене *SMN1*, которые присутствуют примерно у 3% больных СМА),

95,2% чувствительность в выявлении пониженного числа TREC,

97,7% чувствительность в выявлении пониженного числа KREC.

В исследуемых образцах биологического материала человека, не содержащих ДНК 7 экзона гена *SMN1*, кольцевых молекул TREC и KREC, в результате проведения ПЦР-РВ экспоненциальный рост флуоресценции по заявленным каналам флуоресценции отсутствует или ниже фонового значения. Возможна детекция экспоненциального роста уровня флуоресценции по каналу FAM в случае гомозиготной делеции 7 экзона гена *SMN1* при условии $\Delta Ct = Ct(FAM) - Ct(ROX) > 10$. Специфичность выявления делеций 7 экзона гена *SMN1* в гомо- и гетерозиготном состоянии, а также снижения уровня кольцевых молекул TREC и KREC подтверждена на клиническом материале.

3.2 Аналитическая Специфичность

100% специфичность в выявлении индивидов с 1, 2, 3 и 4 копиями гена *SMN1*,

100% специфичность в выявлении индивидов с нормальным уровнем TREC,

100% специфичность в выявлении индивидов с нормальным уровнем KREC.

В исследуемых образцах биологического материала человека, содержащих ДНК 7 экзона гена *SMN1*, референсного гена, кольцевых молекул TREC и KREC, в результате проведения ПЦР-РВ детектируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по заявленным каналам флуоресценции FAM / SybrGreen, ROX / TexasRed, JOE/HEX, Cy5.

Отсутствие перекрестной неспецифической реакции на целевые олигонуклеотиды набора реагентов подтверждается проведенным компьютерным анализом последовательностей ДНК с помощью программы BLAST+ 2.13.0.

3.3 Воспроизводимость

Воспроизводимость результатов по количеству копий/отсутствию 7 экзона гена *SMN1*, а также уровню кольцевых молекул TREC и KREC подтверждена на 25 образцах биологического материала человека в результате проведения ПЦР-РВ на 2х моделях амплификаторов с использованием набора реагентов как одинаковых, так и разных серий. Показана 95% воспроизводимость результатов.

3.4 Порог обнаружения

Порог обнаружения не менее 0,5-1 нг геномной ДНК на исследуемую пробу.

3.5 Коэффициент вариации

Коэффициент вариации определения количества копий TREC меньше или равен 15%

Коэффициент вариации определения количества копий KREC меньше или равен 15%

3.6 Диапазон измерений количественного определения TREC, KREC

Диапазон измерения кольцевых молекул TREC: 0 – 10^6 копий на 10^5 лейкоцитов

Диапазон измерения кольцевых молекул KREC: 35- 10^6 копий на 10^5 лейкоцитов

3.7 Влияние потенциально интерферирующих веществ

К потенциально интерферирующим веществам, которые могут ингибировать ПЦР, можно отнести антикоагулянты (концентрация ЭДТА должна быть не более 3,60 мг/мл, использование гепарина не допускается), применяемые при взятии крови, а также гемоглобин (концентрация должна быть не более 250 г/л), билирубин (концентрация должна быть не более 500 мкмоль/л) и холестерин (концентрация должна быть не более 12 ммоль/л), источником которых может являться образец биологического материала человека.

Наличие интерферирующих веществ в образце биологического материала выше допустимых концентраций может быть причиной сомнительных и недостоверных результатов. Показателем ингибирования ПЦР является отсутствие или снижение эффективности амплификации референсного гена, а также искажение формы кривой амплификации референсного гена.

Материалы фильтр-карт: основа, пропитки и разметки не оказывают ингибирующего влияния.

При подтверждении наличия в образце биологического материала для анализа ингибирующих примесей рекомендуется повторное взятие биологического материала.

3.8 Диагностические характеристики

По результатам клинических испытаний установлены характеристики диагностической чувствительности и специфичности:

Делеция в 7 экзоне SMN1: диагностическая чувствительность (ДИ 95%) – 100,00% (92,89% - 100,00%); диагностическая специфичность – 100,00% (96,38-100,00%).

TREC: диагностическая чувствительность (ДИ 95%) – 96,00% (79,65-99,90%); диагностическая специфичность – 100,00% (91,59-100,00%).

KREC: диагностическая чувствительность (ДИ 95%) – 100,00% (86,28-100,00%); диагностическая специфичность – 100,00% (91,59-100,00%).

По результатам клинических испытаний подтверждена внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость результатов при использовании набора реагентов «Genome-X SMA/TREC/KREC testing kit». Воспроизводимость составила 100% с 95% доверительным интервалом (97,84-100,00%).

4 ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА РЕЗУЛЬТАТ

- Нарушение настоящей инструкции при подготовке и хранении набора реагентов, взятии, подготовке образцов и выполнении процедуры анализа;
- Наличие интерферирующих веществ в образце (см п. 3.7);
- Переливание крови;
- Проведение терапии, оказывающей влияние на лейкопоз новорожденного после рождения;
- Прохождение во время беременности матерью новорожденного терапии, оказывающей влияние на формирование иммунной системы плода.

5 ОГРАНИЧЕНИЯ

Для корректной оценки генотипирования по 7 экзону гена *SMN1* и уровню кольцевых молекул TREC и KREC количество геномной ДНК на пробирку должно составлять не менее 0,5-1нг геномной ДНК (допустимое значение C_t по каналу детекции референсного гена <31).

У пациентов на парентеральном питании и или получающих инъекции гепарина внутривенно кровь для анализа отбирают не ранее чем через 6 часов после внутривенного вливания.

6 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала с соблюдением методических указаний МУ 1.3.2569-09.

Раскапывание реактивов и образцов биологического материала для проведения ПЦР в реальном времени должно осуществляться в боксе первого класса

Все работы следует проводить только с использованием одноразовых наконечников с аэрозольным барьером для полуавтоматических пипеток. Для каждого образца, содержащего нуклеиновые кислоты, использовать отдельный наконечник.

При работе с набором реагентов следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007.

Перед началом работы необходимо ознакомиться с пользовательскими инструкциями на используемое оборудование и комплекты реагентов. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкций.

При работе следует соблюдать особую осторожность, так как разбрызгивание растворов может привести к контаминации и, как следствие, к ложноположительным результатам.

При удалении отходов не допускать открывания пробирок с продуктами ПЦР и их разбрызгивания, так как это может привести к контаминации рабочих поверхностей и оборудования.

Общие рекомендации и меры предосторожности при проведении анализа:

P103: Прочитайте этикетку перед использованием.

P201: Перед использованием ознакомьтесь со специальными инструкциями.

P301+P330+P331: При проглатывании: прополоскать рот. Не вызывать рвоту.

P305+P351+P338: При попадании в глаза: промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть, и это легко сделать. Продолжайте промывку.

R401: Хранить в соответствии с указанным на упаковке температурным режимом.

R410: Защищать от солнечного света.

7 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Дополнительные материалы и оборудование, не входят в комплект поставки, приобретаются отдельно.

1) Фильтр-карты, например:

- «Карта Whatman FTA Card для хранения и транспортировки биологического материала, с принадлежностями» (РУ № РЗН 2016/4591)

- Карта для сбора образцов биоматериала ("ДНК-карта") по ТУ 9398-256-98539446-2015 (РУ № РЗН 2016/4615)

- Карта для забора и транспортировки биологического материала по ТУ 9398-001-63802255-2016 (РУ № РЗН 2017/6431)

2) ПЦР-бокс 1 класса, оснащенный бактерицидным проточным УФ-рециркулятором воздуха, например, «Бокс для чистых работ» (например, РУ № РЗН 2023/19369).

3) Термоциклер с «горячей крышкой» с возможность нагрева пробы до 99°C,

возможность нагрева крышки до 105°C, например, «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот T100 (T100 Thermal Cycler)» ФСЗ 2012/12788; «Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler, с принадлежностями» (ПУ № ФСЗ 2011/09244).

- 4) Прибор для ПЦР в реальном времени, оснащенный каналами детекции FAM / SybrGreen, ROX / TexasRed, JOE / HEX, Cy5 с возможностью проведения относительного количественного анализа или метода $\Delta\Delta C_t$. Набор валидирован со следующими приборами:
 - Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 5M1, 5M3, 5M6, 5X1 (ПУ № ФСР 2011/10229),
 - Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени (ПУ № РЗН 2019/8446)
- 5) центрифуга для микропробирок / планшетов Центрифуга-вортекс для ПЦР планшетов, пригодная для 96-луночных ПЦР планшетов или настольная миницентрифуга для микропробирок microspin, например, «Центрифуга/вортекс Комбиспин FVL-2400N» (Biosan) (ПУ № ФС №2005/514)
- 6) Дозатор пипеточный варьируемый одноканальный, ГОСТ 10223-97 класс 0,2 Объем дозирования 0,1 ... 1 мкл,
- 7) Дозатор пипеточный варьируемый одноканальный, ГОСТ 28311-89 Объем дозирования 0,5 ... 10 мкл,
- 8) Дозатор пипеточный варьируемый одноканальный, ГОСТ 28311-89 Объем дозирования 20 ... 200 мкл,
- 9) Дозатор пипеточный варьируемый одноканальный, ГОСТ 28311-89 Объем дозирования 100 ... 1000 мкл,
- 10) Наконечники к пипеткам Полуавтоматические с аэрозольным барьером, сертифицированные на отсутствие ДНКаз, например, «Наконечники для дозаторов в штативе и без штатива» 0,5-10 мкл ФСЗ 2012/12495 (Guangzhou Jet Bio-Filtration Co), «Наконечник для дозатора» 100 мкл, 300 мкл, 1000 мкл (Yancheng Huida Medical Instruments Co) (ПУ № ФСЗ 2011/10017)
- 11) Устройство для пробивки образцов пятен высушенной крови ручной или автоматический (панчер) с возможностью выбивания кружка диаметром 3,2 мм, например, Валлак DBS панчер МЗ (ПУ № РФ № 2000/776)
- 12) Холодильник, от 2 до 8 °C
- 13) Морозильная камера, от минус 22 до минус 18 °C
- 14) Микропробирки для приготовления мастер-миксов для ПЦР не контаминированные ДНК, ДНКазы и РНКазы, объемом 1,5 мл или 2 мл, пригодные для центрифугирования, например Микропробирка, в том числе для криохранения (ПУ № ФСЗ 2011/09223)
- 15) Штативы для микропробирок для объема 1,5 мл
- 16) Компьютер, оснащенный кабелем, пригодным для соединения с ПЦР-амплификатором и совместимый с программным обеспечением

8 ИНФОРМАЦИЯ ОБ УСЛОВИЯХ, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ СБОРА, ОБРАБОТКИ И ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ

Для анализа используются сухие пятна крови на фильтр-карте. Взятие крови новорожденных для получения сухого пятна крови осуществляют в соответствии с рекомендациями по забору крови при проведении массового обследования новорожденных детей на наследственные заболевания (Приложение № 2 к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 22 марта 2006 года, № 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные болезни») и инструкциями производителей к бумажным фильтр-картам.

Рекомендуется наносить кровь на фильтр-карту в соответствии с ограничивающей разметкой, при этом кровь должна пропитать бумагу насквозь. После нанесения крови фильтр-карта высушивается в горизонтальном положении на чистой сухой поверхности не менее 2 часов без применения дополнительной тепловой обработки.

Для получения сухого пятна допускается использование образца цельной периферической крови, предварительно забранной в пробирку с антикоагулянтом этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА). После забора крови необходимо перевернуть пробирку 2-3 раза для перемешивания крови с антикоагулянтом. Допускается транспортирование и хранение образцов цельной крови в пробирках при температуре от +2°C до +8°C до 3-х суток. Допускается замораживание и хранение крови в пробирках при температуре от -10°C до -30 °C.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование крови, забранной в пробирку с антикоагулянтом гепарин.

Транспортировка и хранение образцов на фильтр-картах после высушивания проводится в соответствии с инструкциями производителей. Срок хранения тест-бланков регламентируется методическими рекомендациями «Метод получения сухого пятна крови на тест-бланк для проведения клинико-лабораторных исследований»/Ассоциация медицинских генетиков. Российское общество неонатологов. 2022 г.

Для анализа образца из области фильтр-карты, пропитанной кровью с двух сторон, с помощью ручного или автоматического панчера выбивается диск диаметром 3,2 мм в пробирку для дальнейшего выделения ДНК.

9 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1 Выделение ДНК из сухих пятен крови на фильтр-карте.

1. Приготовить 1х раствор для элюции, разведя 100X раствор для элюции с помощью ампулированной или бидистиллированной воды 1:99 из расчета 250 мкл 1х раствора на пробу.

Рассчитать количество 1х раствора для элюции, необходимого для эксперимента, по формуле:

$$2,5 \cdot (n+1) \text{ мкл } 100X \text{ раствора для элюции} + 247,5 \cdot (n+1) \text{ мкл воды,}$$

где n – количество образцов

2. С помощью панчера выбить из сухого пятна крови кружок диаметром 3,2 мм в лунку 96-луночного планшета или пробирку объемом 0,2 мл.

ВНИМАНИЕ! перед выбиванием образца сухого пятна рекомендуется сделать несколько высечек на чистом месте листа фильтровальной бумаги, для снижения риска перекрестной контаминации образцов

3. Добавить 100 мкл 1х раствора.

4. Инкубировать в течение 15 минут при комнатной температуре.

5. Перемешать, дважды пипетируя жидкость, затем удалить как можно больше жидкости.

6. Повторить п. 3-5.

7. Добавить 50 мкл 1х раствора, убедившись, что фильтр полностью погружен.

8. Запечатать планшет или закрыть пробирки, сбросить капли на центрифуге.

9. Нагреть образцы в течение 15 минут при температуре +99°C в термоциклере с «горячей крышкой».

При необходимости выделенные образцы ДНК хранить при 4°C не более 4 недель (при пересыхании/испарении можно добавить ампулированной воды для инъекций или бидистиллированной воды 10-30 мкл)

9.2 Подготовка к постановке ПЦР в реальном времени

1. Каждый образец ДНК анализировать дважды. Для контроля качества параллельно анализируемым образцам провести анализ образцов ДНК, входящих в набор.
2. Разморозить MasterMix. После размораживания сбросить капли на центрифуге, перемешать мягким вортексом и/или пипетированием.
3. Отобрать в отдельную пробирку (А) необходимое количество MasterMix из расчета 17,6 мкл на образец, с запасом равным аликвоте на 2-4 дополнительных образца. Остатки MasterMix хранить при минус 20°C.
4. К MasterMix в пробирке А добавить Полимеразу из расчета 0,4 мкл на каждые 17,6 мкл MasterMix. Тщательно перемешать готовую смесь на мягком вортексе или пипетированием. Остатки Полимеразы хранить при минус 20°C.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу следует доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием

5. В каждую пробирку для ПЦР-РВ (или лунку планшета) раскапать по 18 мкл готовой смеси. Далее раскапать все образцы в 2 повторах (по две пробирки/лунки планшета на один образец) и образцы контрольных ДНК (ДНК SMN1 del/del, ДНК SMN1 +/-del, ДНК SMN1 +/+) по 2 мкл, в последние 2 пробирки не добавлять ДНК (контроль на контаминацию).

ВНИМАНИЕ! Соблюдайте аккуратность соответствия маркировки пробирок/лунок планшета, применяемых в анализе, и сведений в системе регистрации образцов.

6. Удалите капли со стенок пробирок/планшета центрифугированием.
7. Поместите пробирки/планшет в прибор для ПЦР в реальном времени.
8. Детекция флуоресцентного сигнала должна проводиться по каналам для флуорофоров FAM / SybrGreen, ROX / TexasRed, JOE/HEX, Cy5

9.3 Проведение ПЦР в реальном времени на приборах Applied Biosystems QuantStudio 5

9.3.1 Параметры определения

Задать следующие настройки прибора:

- 1) Тип анализа – Comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$)
- 2) Условия реакции (вкладка «метод» (Method):

предварительная денатурация	1 цикл	95 °C - 5 мин
амплификация	40 циклов	94°C - 10 сек 62° - 25 сек – считывание сигнала 72° - 15 сек

- 3) Во вкладке мишени и образцы:

- Задать мишени, перейдя на страницу расширенных настроек: SMN1 – FAM, TREC – VIC, KREC – Cy5, референс – ROX.
- Подписать образцы.
- Убрать задаваемый по умолчанию референс (ROX), и выбрать в качестве эндогенного контроля референсный ген, а также указать ДНК SMN1 +/- в качестве референсного образца.
- 4) Запустить протокол на приборе, нажав кнопку «Старт» (Run)
- 5) По окончании амплификации на вкладке «Результаты» нажать кнопку «Анализ» (Analyze) и во всплывающем окне «Amplification plot» проверить пороговые уровни для каждой мишени. При необходимости убрать галочку с автоматического выбора порогового уровня и задать для пороговых уровней следующие значения:
 - SMN1 ~ 15000-25000
 - референс ~ 45000-65000
 - TREC ~ 2000-4000
 - KREC ~ 2000-4000

ВНИМАНИЕ! Эффективность реакции может немного варьировать в зависимости от партии, поэтому выставлять пороговый уровень флуоресценции следует, опираясь на следующие утверждения:

1. Пороговый уровень должен превышать фоновую флуоресценцию, т.е. флуоресценцию на ранних циклах до экспоненциального роста кривых амплификации (для SMN1 и референсного гена пороговый уровень должен превышать флуоресценцию, которая наблюдается до 20 цикла, для TREC и KREC - до 28 цикла).

2. Средние значения Ct должны составлять:

~27,5 для ROX,
26,5 для FAM,
31,5 для VIC,
32 для Cy5.

- 6) После выставления пороговых уровней нажать кнопку «Анализ» (Analyze) для перерасчета значений с учетом введенных параметров.

9.3.2 Интерпретация результатов исследования 7 экзона гена SMN1:

Для получения результатов амплификации открываем во вкладке «Результаты» окно «Экспрессия генов».

В таблице результатов смотрим показатель RQ.

- **Результат анализа положительный (обнаружена СМА),** если пороговый цикл (Ct) и RQ по каналу детекции FAM не определяется при условии Ct по каналу детекции ROX <31.
- **Результат анализа положительный (обнаружено гетерозиготное носительство СМА),** если RQ равно $0,5 \pm 0,2$.
- **Результат анализа отрицательный (СМА не обнаружена),** если RQ для образца будет равным $1 \pm 0,25$ (для 2 копий), $1,5 \pm 0,25$ (для 3 копий), $2 \pm 0,25$ (для 4 копий).
- **Результат анализа невалидный:**

1) если для данной пробы $Ct(ROX) > 31$.

2) для данной пробы одна аликвота показала положительный результат, а вторая – отрицательный.

В этом случае требуется повторная постановка ПЦР с данным образцом или повторное выделение образца;

- Результат анализа сомнительный:

1) Если в результате проведения относительного количественного анализа или метода $\Delta\Delta Ct$ значение RQ для образца будет лежать в диапазоне от 0 до 0,3, а также иметь промежуточные значения (от 0,7 до 0,75).

2) Если кривые амплификации имеют нестандартную форму.

3) Если разница в Ct между двумя повторностями одного образца > 1 .

В этих случаях требуется повторная постановка ПЦР с данным образцом или повторное выделение образца.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации.

9.3.3 Интерпретация результатов исследования TREC:

Для интерпретации результатов рекомендуется использовать программу Excel или другое программное обеспечение, предназначенное для математического обчета данных.

Экспортируйте (вкладка Export) данные и примените к каждой пробе расчет по формуле (1) для каналов детекции TREC(VIC) и референс (ROX), используя значения $Ct\ mean$.

$$\text{Количество копий} = 10^{((Ct(ROX) - Ct(VIC))/2) * 120000} \quad (1)$$

где Количество копий - число копий TREC на 10^5 лейкоцитов

$Ct(ROX)$ – пороговый цикл референсного гена,

$Ct(VIC)$ – пороговый цикл TREC,

Результат анализа «норма» при значении числа копий TREC на 10^5 лейкоцитов > 350 ;

Результат анализа «высокий риск иммунодефицитных состояний» при значении числа копий TREC на 10^5 лейкоцитов меньше 120

Результат анализа сомнительный: при значении числа копий TREC на 10^5 лейкоцитов от 120 до 350

Результат анализа невалидный, если для данной пробы $Ct(ROX) > 31$.

В этом случае требуется повторная постановка ПЦР с данным образцом или повторное выделение образца.

ВНИМАНИЕ! Результаты исследования на первичные иммунодефициты могут быть интерпретированы только в комплексе с другими исследованиями, возрастом новорожденного и клинической картиной.

9.3.4 Интерпретация результатов исследования KREC:

Для интерпретации результатов рекомендуется использовать программу Excel или другое программное обеспечение, предназначенное для математического обчета данных.

Экспортируйте (вкладка Export) данные и примените к каждой пробе расчет по формуле (2) для каналов детекции KREC (Cy5) и референс (ROX), используя значения Ct mean.

$$\text{Количество копий} = 10^{((Ct(ROX) - Ct(Cy5))/2) * 250000} \quad (2)$$

где Количество копий - число копий KREC на 10^5 лейкоцитов

Ct(ROX) – пороговый цикл референсного гена,

Ct(Cy5) – пороговый цикл KREC.

Результат анализа «норма» при значении числа копий KREC на 10^5 лейкоцитов > 450;

Результат анализа «высокий риск иммунодефицитных состояний» при значении числа копий KREC на 10^5 лейкоцитов меньше 150

Результат анализа сомнительный: при значении числа копий KREC на 10^5 лейкоцитов от 150 до 450

Результат анализа невалидный, если для данной пробы Ct(ROX) > 31.

В этом случае требуется повторная постановка ПЦР с данным образцом или повторное выделение образца.

ВНИМАНИЕ! Результаты исследования на первичные иммунодефициты могут быть интерпретированы только в комплексе с другими исследованиями, возрастом новорожденного и клинической картиной.

9.4 Проведение ПЦР в реальном времени на приборе ДТпрайм

9.4.1 Параметры определения

Задать следующие настройки прибора:

- 1) Тип анализа – Мультиплекс, метод – Пороговый.
- 2) Пробирки – образец.
- 3) Объем рабочей смеси – 20 мкл.
- 4) Флуорофоры – Fam, Hex, Cy5, Rox (BK).
- 5) Программа амплификации:

предварительная денатурация	1 цикл	95 °C - 5 мин
амплификация	40 циклов	$\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} - 10 \text{ сек} \\ 62^{\circ} - 25 \text{ сек} - \text{считывание сигнала} \\ 72^{\circ} - 15 \text{ сек} \end{array} \right.$

- 6) Добавить тест: указать количество образцов. Дубли: 2.
- 7) Нажать кнопку «Старт»

- 8) По окончании амплификации проверить пороговые уровни флуоресценции. Рекомендуется задать для порогового уровня амплификации мишеней следующие значения:
- Fam ~ 120
 - Rox ~ 280
 - Hex ~ 50
 - Cy5 ~ 10

ВНИМАНИЕ! Эффективность реакции может немного варьировать в зависимости от партии, поэтому выставлять пороговый уровень флуоресценции следует чтобы средние значения Ct составляли:

~27,5 для ROX,
26,5 для FAM,
31,5 для VIC,
32 для Cy5.

При отличии средних значений Ct эмпирическим путем скорректируйте задаваемые значения порогового уровня мишеней.

9.4.2 Интерпретация результатов исследования 7 экзона гена SMN1:

Для интерпретации результатов рекомендуется использовать программу Excel или другое программное обеспечение, предназначенное для математического обчета данных. Для интерпретации результатов исследования 7 экзона гена SMN1 учитываются сигналы по каналу FAM и ROX

Экспортируйте данные и примените к каждой пробе расчет по формуле (3) или (4):

- 1) если эффективность амплификации по FAM и ROX совпадает:

$$RQ=2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3)$$

Где:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{образца}) - \Delta Ct(\text{контроля SMN1 +/+})$$

$$\Delta Ct(\text{образца}) = Ct(FAM) - Ct(ROX)$$

$$\Delta Ct(\text{контроля SMN1 +/+}) = Ct(FAM) - Ct(ROX)$$

- 2) если эффективности амплификации различаются более, чем на 5%

$$RQ = (E_{ROX})^{\Delta Ct(ROX)} / (E_{FAM})^{\Delta Ct(FAM)} \quad (4)$$

Где E – эффективность амплификации:

$$\Delta Ct(FAM) = Ct_{FAM}(\text{контроля SMN1 +/+}) - \Delta Ct_{FAM}(\text{образца})$$

$$\Delta Ct(ROX) = Ct_{ROX}(\text{контроля SMN1 +/+}) - \Delta Ct_{ROX}(\text{образца})$$

RQ=1 - норма

RQ=0,5 – носитель

- Результат анализа положительный (обнаружена СМА), если RQ =0 или не определяется.

- Результат анализа положительный (обнаружено гетерозиготное носительство СМА), если RQ равно $0,5 \pm 0,2$.

- Результат анализа отрицательный (СМА не обнаружена), если RQ для образца будет равным $1 \pm 0,25$ (для 2 копий), $1,5 \pm 0,25$ (для 3 копий), $2 \pm 0,25$ (для 4 копий).

- Результат анализа невалидный:

1) если для данной пробы $Ct(ROX) > 31$.

2) для данной пробы одна аликвота показала положительный результат, а вторая – отрицательный.

В этом случае требуется повторная постановка ПЦР с данным образцом или повторное выделение образца;

- Результат анализа сомнительный:

1) Если значение RQ для образца будет лежать в диапазоне от 0 до 0,3, а также иметь промежуточные значения (от 0,7 до 0,75)

2) Если кривые амплификации имеют нестандартную форму.

3) Если разница в Ct между двумя повторностями одного образца > 1 .

В этих случаях требуется повторная постановка ПЦР с данным образцом или повторное выделение образца.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации.

9.4.3 Интерпретация результатов исследования TREC

Для интерпретации результатов рекомендуется использовать программу Excel или другое программное обеспечение, предназначенное для математического обсчета данных. Для интерпретации результатов исследования TREC учитываются сигналы по каналам флуоресценции HEX и ROX, см п. 9.3.3

9.4.4 Интерпретация результатов исследования KREC:

Для интерпретации результатов рекомендуется использовать программу Excel или другое программное обеспечение, предназначенное для математического обсчета данных. Для интерпретации результатов исследования TREC учитываются сигналы по каналам флуоресценции Cy5 и ROX, см п. 9.3.4

10 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контрольные материалы, входящие в состав набора реагентов, не имеют приписанного значения и используются только для оценки прецизионности процедуры измерения, ее повторяемости или воспроизводимости (контрольные материалы прецизионности), к ним не применимы требования ГОСТ ISO 17511-2011.

Для оценки правильности определения проводится контроль:

На контаминацию: в двух последних пробирках штатива (лунках планшета) проводят все стадии проведения анализа без добавления ДНК

Образцы ДНК: ДНК SMN1 del/del и ДНК SMN1 +/-del, входящие в набор реагентов используются для контроля гомозиготной и гетерозиготной делеций при анализе на СМА.

ДНК SMN1 +/-+ используется в качестве контрольного материала здорового человека.

Контроль проводится постановкой контрольных образцов и анализ всех реагентов без добавления ДНК по методике, указанной в п. 9.2 с интерпретацией по указаниям п. 10

11 УПАКОВКА

11.1 Индивидуальная упаковка компонентов набора реагентов

Все компоненты набора реагентов упакованы в индивидуальную упаковку: полипропиленовые пробирки объемом 0,5 мл или 2 мл с винтовой горловиной и закручивающимися крышками:

На каждую пробирку наклеена этикетка самоклеящаяся, или этикетка из бумаги писчей по ГОСТ 18510-87 с маркировкой.

11.2 Потребительская упаковка набора реагентов

Потребительская упаковка представляет собой 2 коробки из картона для потребительской тары по ГОСТ 7933-89:

Коробка №1 размером 130x75x25 мм (± 3 мм), содержит ложемент из полипропилена размером 128x73x15 мм (± 3 мм), в который установлены компоненты набора реагентов в индивидуальных упаковках: 100X раствор для элюции; MasterMix; полимеразы и паспорт качества.

Коробка №2 размером 130x75x25 мм (± 3 мм), содержит ложемент из полипропилена размером 128x73x15 мм (± 3 мм), в который установлены следующие компоненты набора реагентов: ДНК SMN1 del/del; ДНК SMN1 +/-; ДНК SMN1 ++ и паспорт качества.

Коробки с наборами реагентов должны быть оклеены или запаяны в пленку так, чтобы они не могли быть вскрыты без нарушения целостности упаковки.

Инструкция по применению входит в комплект поставки набора реагентов.

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Транспортирование Набор реагентов должно осуществляться крытыми транспортными средствами всеми видами транспорта, компоненты набора реагентов транспортировать в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах при температурном режиме, согласно условиям хранения. Время транспортирования не ограничено при условии соблюдения температурного режима. Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Хранение

Компоненты набора реагентов в оригинальной упаковке изготовителя в коробке №1 следует хранить на складе в морозильных камерах при температуре от минус 30 °С до минус 10 °С в течение всего срока годности – 12 месяцев.

Компоненты набора реагентов в оригинальной упаковке изготовителя в коробке №2 («Genome-X SMA/TREC/KREC testing kit» Набор контролей) следует хранить на складе в холодильных камерах при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение всего срока годности – 12 месяцев.

Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

Набор реагентов после вскрытия необходимо хранить:

MasterMix и полимеразу в морозильных камерах при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С. В ходе работы допускается не более 6 циклов заморозки / разморозки.

100X раствор для элюции - при комнатной температуре от плюс 15 °С до плюс 25 °С в защищенном от света месте.

ДНК SMN1 del/del; ДНК SMN1 +/-; ДНК SMN1 ++ - в холодильнике с контролем установленной температуры при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением температурного режима, в поврежденной упаковке, не соответствующие описанию по внешнему виду, с истекшим сроком годности применению не подлежат.

Эксплуатация.

- температура окружающего воздуха плюс $(25 \pm 10)^\circ\text{C}$;
- относительная влажность воздуха от 45 до 80%;
- атмосферное давление от 630 до 800 мм.рт.ст.

13 УТИЛИЗАЦИЯ

Утилизации подлежат все наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности.

Утилизация должна проводиться в соответствии с действующими на момент утилизации правилами и требованиями, включая требования местных организаций и правила утилизации в данном регионе.

В Российской Федерации утилизация изделия осуществляется в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 287-113.

Компоненты, входящие в состав набора реагентов, относятся к классу Г - токсикологически опасные отходы, контроли, входящие в состав набора реагентов, относятся к классу Б - эпидемиологически опасные отходы - и должны быть утилизированы в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации.

Утилизация должна проводиться специализированными организациями.

Упаковка, в том числе и транспортная, должна утилизироваться как отходы класса А - эпидемиологически безопасные отходы, приближенные к твердым коммунальным отходам.

Сливы набора реагентов, образующиеся при проведении анализа должны утилизироваться как отходы класса Б - эпидемиологически опасные отходы.

14 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

- 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 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 ин витро. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики ин витро для профессионального применения;
- ГОСТ Р ИСО 23640-2015 - Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro;
- ГОСТ Р 51352-2013 - Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний;
- ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования

15 ЛИТЕРАТУРНЫЕ ССЫЛКИ

1. Markowitz JA, Priyamvada S, Darras BT. Spinal muscular atrophy: a clinical and research update. *PediatrNeurol.* 2012;46(1):1-12.
2. Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Forrest E, et al. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *J NeurolSci.* 1997;146(1):67-72.
3. Lefebvre, S.; Bürglen, L.; Reboullet, S.; Clermont, O.; Burlet, P.; Viollet, L.; Benichou, B.; Cruaud, C.; Millasseau, P.; Zeviani, M.; Le Paslier, D.; Frézal, J.; Cohen, D.; Weissenbach, J.;

- Munnich, A.; Melki, J. Identification and Characterization of a Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene. *Cell*, 1995, 80 (1), 155–165.
- Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *HumMutat.* 2000;15(3):228–237.
 - Monani, U.R.; Lorson, C.L.; Parsons, D.W.; Prior, T.W.; Androphy, E.J.; Burghes, A.H.M.; McPherson, J.D. A Single Nucleotide Difference That Alters Splicing Patterns Distinguishes the SMA Gene SMN1 from the Copy Gene SMN2. *Hum. Mol. Genet.*, 1999, 8 (7), 1177–1183.
 - Serana, F., Chiarini, M., Zanotti, C., Sottini, A., Bertoli, D., Bosio, A., . . . Imberti, L. (2013). Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *Journal of Translational Medicine*, 11(1)
 - Borte, S., Von Döbeln, U., Fasth, A., Wang, N., Janzi, M., Winiarski, J., . . . Hammarström, L. (2012). Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood*, 119(11), 2552-2555
 - King, J. R., & Hammarström, L. (2018). Newborn screening for primary immunodeficiency diseases: History, current and future practice. *Journal of Clinical Immunology*, 38(1), 56-66
 - Kwok, J. S., Cheung, S. K., Ho, J. C., Tang, I. W., Chu, P. W., Leung, E. Y., ... & Lau, Y. L. (2020). Establishing simultaneous T cell receptor excision circles (TREC) and K-deleting recombination excision circles (KREC) quantification assays and laboratory reference intervals in healthy individuals of different age groups in Hong Kong. *Frontiers in immunology*, 11, 1411.
 - Medova, V., Hulinkova, I., Laiferova, N., Urdova, V., Ciznar, P., Dolnikova, D., Krasnanova, V., Fabri, O., Ficek, A., Soltysova, A. (2022) The importance of defining the age-specific TREC/KREC levels for detection of various inborn errors of immunity in pediatric and adult patients. *Clinical Immunology*, Volume 245, 109155, ISSN 1521-6616

16 СИМВОЛЫ, НАНОСИМЫЕ НА УПАКОВКУ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Предел температуры
	Осторожно!		Не допускать воздействия солнечного света
	Обратитесь к инструкции по применению		Беречь от влаги
	Содержимого достаточно для проведения n-тестов		Хрупкое. Обращаться осторожно
	Дата утверждения или последнего пересмотра инструкции по применению		Верх
	Контроль		

17 СВЕДЕНИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

ООО «Геном-Микс»,
199178, г. Санкт-Петербург, вн.тер.г. муниципальный округ Остров Декабристов, наб. реки
Смоленки, д. 5-7, лит. П, помещ. 2-н, офис 2-21/1

тел: 88007072319

почта: genommix@gmail.com

web сайт: www.neva-sma.ru

18 ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Срок годности набора реагентов – 12 месяцев с дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

19 КОНТАКТЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕНИЯ РЕКЛАМАЦИЙ

Рекламации и сообщения о событиях, имеющих признаки неблагоприятного события, принимаются предприятием-изготовителем:

ООО «Геном-Микс», 199178, г. Санкт-Петербург, вн.тер.г. муниципальный округ Остров Декабристов, наб. реки Смоленки, д. 5-7, лит. П, помещ. 2-н, офис 2-21/1,

тел: 88007072319

почта: genommix@gmail.com

web сайт: www.neva-sma.ru

Приложение А
(информационное)

Референсные интервалы кольцевых ДНК-элементов TREC и KREC у здоровых людей в зависимости от возраста.

Таблица А1. Разброс значений количества копий кольцевых ДНК-элементов TREC и KREC у здоровых людей для разных возрастных групп (обследовано 9254 человека) (Medova et al., 2022).

Возраст		Количество копий TREC на 10^5 клеток			Количество копий KREC на 10^5 клеток		
		Min	Max	Median	Min	Max	Median
<28 дней	сухие	38,1	1338766,8	2979,28	6,62	43205,12	843,75
28 – 365 дней	пятна	171,75	3547994,27	2959,24	142,05	12602,55	1074,98
0-1 г	крови	38,10	3547994,27	2959,24	6,62	43205,12	880,77
<28 дней	цельн	1116,62	25176,8	6938,5	141,16	4302,24	1160,14
28 – 365 дней	ая	762,86	42622,97	9767,16	136,5	13068,68	3238,73
0-1 г	кровь	762,86	42622,97	8921,29	136,5	13068,68	2391,15
2-4 г		1537,6	26225,36	7160,62	322,68	7001,33	2218,57
5-10 г		777,5	15597,3	4701,7	249,51	5049,01	957,73
11-15 г		679,73	9299,32	3129,14	108,56	1956,16	667,95
16-20 г		323,63	6089,1	1927,4	91,04	1992,85	545,22
21-30 г		77,57	5626,12	1319,18	16,9	2722,46	350,17
31-40 г		93,77	4209,8	1261,61	56,03	1971,11	356,46
41-50 г		9,78	2949,52	449,42	9,73	1756,09	295,71
51-60 г		5,46	3475,98	334,87	60,4	1790,74	364,82

Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

20 (двадцать) лист (01)

Генеральный директор ООО «Гено-Микс»



Д. Н. Дейниченко

Паспорт качества №
«Genome-X SMA/TREC/KREC testing kit.

Набор реагентов для выявления гомо-и гетерозиготных делеций в гене SMN1, отвечающего за развитие спинальной мышечной атрофии, и внехромосомных кольцевых ДНК, как биомаркеров первичных иммунодефицитов»

согласно ТУ 21.20.23-001-71944992-2022

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «Геном-Микс»

Адрес: 199178, г. Санкт-Петербург, вн.тер.г. муниципальный округ Остров Декабристов, наб. реки Смоленки, д. 5-7, лит. П, помещ. 2-н, офис 2-21/1. тел: 88007072319

Партия № _____ Наборов в партии _____ шт. Дата изготовления _____ г.

№ п/п	Наименование компонентов набора реагентов	Серия	Количество в упаковке
1	100X раствор для элюции		300 мкл, 1 пробирка;
2	MasterMix		3700 мкл (2 пробирки по 1850 мкл);
3	Полимераза		85 мкл, 1 пробирка;
4	ДНК SMN1 del/del		20 мкл, 1 пробирка;
5	ДНК SMN1 +/-del		20 мкл, 1 пробирка;
6	ДНК SMN1 +/-+		20 мкл, 1 пробирка;

Результаты контроля

Наименование параметра	Норма по ТУ	Значение параметра
Комплектность, состав	Комплект включает набор реагентов, паспорт качества – 2 шт. Состав: 100X раствор для элюции – 300 мкл, 1 пробирка; MasterMix – 3700 мкл (2 пробирки по 1850 мкл); Полимераза – 85 мкл, 1 пробирка; ДНК SMN1 del/del - 20 мкл, 1 пробирка; ДНК SMN1 +/-del - 20 мкл, 1 пробирка; ДНК SMN1 +/-+ - 20 мкл, 1 пробирка;	Соответствует Комплект включает набор реагентов, паспорт качества- 2 шт. Состав: 100X раствор для элюции – 300 мкл, 1 пробирка; MasterMix – 3700 мкл (2 пробирки по 1850 мкл); Полимераза – 85 мкл, 1 пробирка; ДНК SMN1 del/del - 20 мкл, 1 пробирка; ДНК SMN1 +/-del - 20 мкл, 1 пробирка; ДНК SMN1 +/-+ - 20 мкл, 1 пробирка;



Наименование параметра	Норма по ТУ	Значение параметра
Упаковка, маркировка	Полипропиленовые пробирки, 1,5 мл с закручивающимися крышками Этикетки из бумаги этикеточной.	Соответствует Полипропиленовые пробирки, 1,5 мл с закручивающимися крышками. Этикетки из бумаги этикеточной.
100X раствор для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость без осадка
MasterMix	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость без осадка
Полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость без осадка
ДНК SMN1 del/del	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость без осадка
ДНК SMN1 +/-del	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость без осадка
ДНК SMN1 +/-	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость без осадка
Воспроизводимость определения SMN1	Не менее 95 % испытанных проб должны показать значение, соответствующее целевому значению.	Соответствует 21 из 22 проб соответствуют целевому значению

Паспорт выдан _____. Срок годности набора до _____.

Хранение. Компоненты набора реагентов в оригинальной упаковке изготовителя в коробке №1 следует хранить на складе в морозильных камерах при температуре от минус 30 °C до минус 10 °C в течение всего срока годности – 12 месяцев.

Компоненты набора реагентов в оригинальной упаковке изготовителя в коробке №2 («Genome-X SMA/TREC/KREC testing kit» Набор контролей») следует хранить на складе в холодильных камерах при температуре от плюс 2 °C до плюс 8 °C в течение всего срока годности – 12 месяцев.

Транспортирование. Набор реагентов должно осуществляться крытыми транспортными средствами, компоненты набора транспортировать в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах при температурном режиме согласно условиям хранения. Время транспортирования не ограничено при условии соблюдения температурного режима.

Изделия, хранившиеся с нарушением температурного режима, в поврежденной упаковке, не соответствующие описанию по внешнему виду, по истечению срока годности применению не подлежат.

Только для in vitro диагностики

РУ _____

ОКК _____