



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ГОРДИЗ»

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'S. Leonov', written over a horizontal line.

Леонов С.Н.
«28» августа 2025 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для качественного обнаружения гомозиготной делеции 7 экзона гена SMN1 человека методом ПЦР в реальном времени с детекцией кривых плавления (IVD-TEST SMN) по ТУ 20.59.52-005-85818162-2022

IVD_TEST



ООО «ГОРДИЗ»,
121205, г. Москва, б-р Большой
(инновационного центра Сколково тер.),
д. 42, стр. 1, эт. 1, пом. 337



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ	3
Научная обоснованность.....	3
2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА.....	4
3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА	5
4. ПРИНЦИП МЕТОДА	5
4.1. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА.....	6
5. ВАРИАНТЫ ИСПОЛНЕНИЯ И СОСТАВ НАБОРА	6
6. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	7
7. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	7
8. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	8
8.1. Требования безопасности при работе с набором.....	8
8.2. Требования охраны окружающей среды.....	9
9. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	9
10. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА	10
10.1. Материал для исследования	10
10.2. Предварительная обработка клинического материала	10
10.3. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой.....	11
11. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	11
11.1. Постановка реакции амплификации исследуемых локусов нуклеиновых кислот	11
12. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	16
13. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	19
13.1. Условия хранения	19
13.2. Транспортирование.....	19
14. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ.....	19
15. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	19
16. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ	20
17. ПЕРЕЧЕНЬ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ.....	21

IVD-TEST SMN

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

СМА	- спинальная мышечная атрофия
MLPA	- от <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i> – метод мультиплексной амплификации лигированных зондов
SMN1	- от англ, <i>survival of motor neuron 1</i> - «ген выживаемости моторных нейронов 1»
SMN2	- от англ, <i>survival of motor neuron 2</i> - «ген выживаемости моторных нейронов 2»
К-	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец К+
НК	- нуклеиновые кислоты
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
мкл	- микролитр
мл	- миллилитр
п.н.	- пары нуклеотидов
dF/dT	- производная функции флуоресценции от времени

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов IVD-TEST SMN предназначен для качественного обнаружения гомозиготной делеции 7 экзона гена SMN1 в биологическом материале (сухие пятна крови) новорожденных в целях проведения скрининга на спинальную мышечную атрофию.

Функциональное назначение:

Набор реагентов IVD-TEST SMN может быть использован в клинической лабораторной диагностике с целью проведения неонатального скрининга новорожденных для обнаружения врожденной патологии, связанной со спинальной мышечной атрофией.

Научная обоснованность

5q-ассоциированная, или проксимальная, спинальная мышечная атрофия (СМА) — это тяжёлое нервно-мышечное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, которое развивается вследствие гомозиготных (реже — компаунд-гетерозиготных) патогенных вариантов в гене SMN1 и характеризуется неуклонной дегенерацией мотонейронов спинного мозга и ствола головного мозга, что обуславливает развитие прогрессирующей мышечной атрофии и вялых парезов. [1]

Ген SMN1 локализован на 5-й хромосоме (локус 5q12.2-q13.3), ближе к теломере.

Данный участок является сложным и генетически нестабильным. Примерно в 95 % случаев причиной развития СМА являются гомозиготные делеции экзонов 7 или 7–8 гена SMN1. В остальных случаях у пациентов выявляется компаунд-гетерозиготное состояние по делеции в одной копии гена SMN1 и иным патогенным вариантом (нонсенс, миссенс, варианты в зоне сплайсинга, инсерции, малые делеции) в другой. [1]

В случае гетерозиготного носительства делеции экзонов 7 или 7–8 гена SMN1 и отсутствия патогенных вариантов на втором аллеле этого гена СМА не развивается. Помимо СМА, других заболеваний, связанных с патогенными вариантами в гене SMN1, в настоящее время не описано.

У людей и других высших приматов SMN1 имеет паралогичную центромерную копию — ген SMN2. В обычной популяции (без СМА) примерно у 10–15 % людей SMN2

IVD-TEST SMN

вовсе отсутствует. Число копий гена SMN2 у пациентов с СМА варьирует, как правило, от одной до четырёх-пяти (крайне редко — до восьми). В отличие от гена SMN1, в экзоне 7 гена SMN2 в 840-м положении цитозин заменён на тимин. Несмотря на то, что такая замена не влияет на аминокислотную последовательность, это приводит к нарушению работы экзонного энхансера сплайсинга и альтернативному сплайсингу пре-мРНК, образующейся с гена SMN2, с исключением экзона 7 в 90 % транскриптов SMN2 [7,8]. Это обуславливает образование с таких транскриптов неполноценной версии белка SMN, которая быстро подвергается внутриклеточной деградации. Тем не менее, около 10 % образуемого с гена SMN2 белкового продукта является полноценным функциональным белком SMN. [1]

По данным итогов пилотного проекта по неонатальному скринингу в Санкт-Петербурге в 2021-2022 гг. частота носительства и заболеваемости СМА составляет 1 на 47 и 1 на 9035 индивидов соответственно. [2]

Необходимость своевременной диагностики заболевания обуславливается критичностью времени начала терапии: применение лекарств до появления симптомов позволяет добиться максимальной эффективности терапии, а если болезнь уже начала проявляется, эффект терапии будет менее выраженным. [2]

Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени с детекцией кривых плавления позволяет достоверно определять наличие или отсутствие делеции 7 экзона гена SMN1 вне зависимости от наличия и числа копий гена SMN2. В основе данного метода лежит ПЦР с применением флуоресцентно-меченых зондов, по-разному гибридизующихся на продуктах амплификации генов SMN1 и SMN2. Для каждого из образующихся дуплексов характерен диапазон температуры их плавления (температуры денатурации), по которому делается вывод о наличии или отсутствии продукта амплификации участка 7 экзона гена SMN1, т.е. о наличии или делеции самого 7 экзона.

1. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q (дети)

2. Глотов А.С. и др. Итоги пилотного проекта по неонатальному скринингу спинальной мышечной атрофии в Санкт-Петербурге: организационные, диагностические и клинические аспекты // Педиатрия им. Сперанского – Том 102, №3 – 2023 г – с. 79-94

3. Методические рекомендации «Метод получения сухого пятна крови на тест-бланк для проведения клинико-лабораторных исследований», 2022 г.

4. Приказ Минздравсоцразвития России от 22.03.2006 года №185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания»

5. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21.04.2022 № 274н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи пациентам с врожденными и (или) наследственными заболеваниями»

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

Клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению: набор реагентов IVD-TEST SMN может быть использован в клинической лабораторной диагностике для качественного обнаружения гомозиготной делеции 7 экзона гена SMN1 в образцах сухих пятен крови новорожденных методом ПЦР в режиме реального времени с целью проведения неонатального скрининга спинальной мышечной атрофии.

IVD-TEST SMN

3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА

Набор реагентов IVD-TEST SMN предназначен только для диагностики *in vitro*, для профессионального применения персоналом, имеющим квалификацию для выполнения диагностических исследований *in vitro* в результате специального образования и обучения.

Исследования могут выполнять сотрудники клинико-диагностических лабораторий не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим образованием:

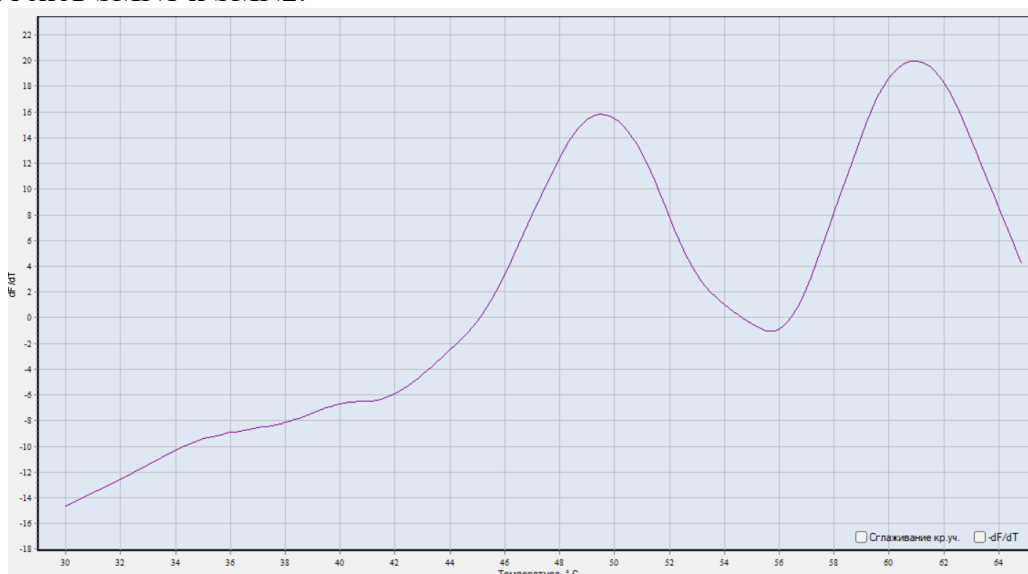
- врач-генетик;
- врач-лабораторный генетик;
- врачи клинической лабораторной диагностики и иные специалисты лабораторий, участвующие в проведении молекулярно-генетических исследований.

4. ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление гомозиготной делеции 7 экзона гена SMN1 с помощью набора реагентов IVD-TEST SMN проводится методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией кривых плавления.

На первом этапе исследуемый биоматериал подвергается процедуре экстракции ДНК. Полученный препарат, содержащий ДНК человека, используется для амплификации целевого участка гена SMN1с помощью полимеразной цепной реакции. Параллельно с данным процессом происходит амплификация гомологичного участка гена SMN2, наличие которого в геноме не имеет клинического значения при скрининге гомозиготной делеции 7 экзона гена SMN1. Несмотря на то, что амплификация участка гена SMN2 не является целью исследования и не имеет диагностического значения при применении данного МИ, наработка копий участка гена SMN2 наряду с целевыми копиями участка гена SMN1 является неизбежным следствием структуры последовательности указанных генов. На следующем этапе – получении кривых плавления – флуоресцентные зонды, используемые в наборе IVD-TEST SMN, гибридизуются с ПЦР-продуктами (ампликонами). При нагреве реакционной смеси образовавшийся дуплекс зонд-ампликон полностью денатурирует при определенной температуре – температуре плавления.

На кривой плавления это соответствует локальному максимуму. Для генов SMN1 и SMN2 характерны индивидуальные температуры плавления, являющиеся аналитической характеристикой исследуемого образца. Разность данных температур составляет 10 °С, благодаря чему возможно достоверно дифференцировать ампликоны 7 экзона генов SMN1 и SMN2.



IVD-TEST SMN

Рисунок. График выявления флуоресцентного сигнала в зависимости от температуры (Типичный результат исследования по качественному обнаружению делеции 7 экзона гена SMN1. Представлен вариант нормы)

Анализ полученных данных проводится в соответствии с Руководством по эксплуатации Амплификатора детектирующего "ДТпрайм", часть 2 для Амплификатора детектирующего "ДТпрайм" по ТУ 9443-004-96301278-2010 в следующих модификациях: 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6, 4X1, 5X1, 6X1 (Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/10229).

Таблица 1
Характеристики анализируемых мишеней

Анализируемая мишень	Диапазон температуры плавления дуплекса зонд-ампликон, °С	Канал детекции
Участок генома – 7 экзона гена <i>SMN1</i>	Наличие кривой плавления с максимумом в области 58 – 63 °С	FAM

4.1. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Для корректной оценки генотипирования по 7 экзону гена SMN1 количество геномной ДНК на амплификационную пробирку должно составлять не менее 1,0 нг геномной ДНК.

К совместному использованию с набором реагентов IVD-TEST SMN рекомендованы:

Набор реагентов для экстракции ДНК человека из сухих пятен крови и цельной крови «МагноПрайм® DrySpot» по ТУ 21.20.23-219-09286667-2023, ООО «НекстБио», Регистрационное удостоверение № РЗН 2024/22489

5. СОСТАВ НАБОРА

Набор реагентов для качественного обнаружения гомозиготной делеции 7 экзона гена SMN1 человека методом ПЦР в реальном времени с детекцией кривых плавления (IVD-TEST SMN) по ТУ 20.59.52-005-85818162-2022 выпускается в 1 варианте исполнения.

Набор рассчитан на проведение исследования 384 образцов, включая контрольные образцы.

В состав набора входят:

- 1) Комплект «Реакционная смесь», включающий:
 - Реакционная смесь – 4 пробирки (960 мкл × 4);
- 2) Комплект «Раствор активатора», включающий:
 - Раствор активатора – 2 пробирки (960 мкл × 2);
- 3) «Комплект контрольных образцов», включающий:
 - Контроль Норма – 1 пробирка (100 мкл);
 - Контроль Патология – 1 пробирка (100 мкл);
 - Отрицательный контроль – 1 пробирка (100 мкл);
- 4) Инструкция по применению.

IVD-TEST SMN

В состав набора входят готовые к применению реагенты.

5.1. Комплектность.

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- паспорт качества (по запросу);
- инструкция по применению на бумажном носителе.

Инструкция по применению в форме электронного документа представлена на сайте производителя www.gordiz.ru (ГОСТ 51088).

6. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

6.1. Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Аналитическая чувствительность набора IVD-TEST SMN / Предел обнаружения гомозиготной делеции 7-го экзона генов SMA1, составляет не менее 1,0 нг геномной ДНК.

Выделение ДНК осуществляется с использованием Набора реагентов для экстракции ДНК человека из сухих пятен крови и цельной крови «МагноПрайм® DrySpot» по ТУ 21.20.23-219-09286667-2023, ООО «НекстБио», Регистрационное удостоверение № РЗН 2024/22489»

6.2. Аналитическая специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами) и флуоресцентными зондами, подобранными к гомологичным участкам 7 экзона генов SMN1, SMN2 человека, что исключает перекрестные реакции с другими мишенями.

Аналитическая специфичность набора реагентов в отношении исследуемых молекулярных мишеней, т.е. способность выявлять в исследуемом образце только участки ДНК, указанные в назначении, а также отсутствие неспецифических реакций с другими участками ДНК доказана производителем при исследовании генноинженерных конструкций (рекомбинантных плазмид), соответствующих 7 экзону SMN1 и SMN2 генов, а также подтверждена на клиническом материале.

В образцах биологического материала, содержащих 7 экзон гена SMN1 во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора регистрирует кривые плавления в соответствующем температурном диапазоне.

В образцах биологического материала человека, не содержащего ДНК 7 экзона гена SMN1, при проведении амплификации не регистрирует кривые плавления в соответствующем температурном диапазоне.

В ходе НИОКР была проведена проверка специфичности набора реагентов биоинформатическими методами. Показано отсутствие перекрестных неспецифических реакций SMN1.

Ложноположительные и ложноотрицательные результаты выявлены не были.

Специфичность, рассчитанная как % истинно отрицательных результатов для отрицательных проб на целевой маркер, составила 100%.

6.3. Повторяемость

Внутрисерийная и межсерийная повторяемость результатов исследования с использованием набора IVD-TEST SMN для всех исследуемых мишеней составляет 100%.

7. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Валидация реагентов, входящих в состав набора, проведена в рамках клинических испытаний на 200 образцах клинического материала, (сухие пятна крови новорожденных).

IVD-TEST SMN

В качестве метода сравнения для всех образцов проведено предварительное исследование с помощью мультиплексной амплификации лигированных зондов.

Диагностическая чувствительность обнаружения гомозиготной делеции 7 экзона гена SMN1 человека: 100 % (интервал 98,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность обнаружения гомозиготной делеции 7 экзона гена SMN1 человека: 100 % (интервал 98,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Воспроизводимость результатов исследования с использованием набора IVD-TEST SMN составляет 100% и подтверждена в ходе проведения клинических испытаний на разных сериях набора (внутрисерийная, межсерийная и внутрисерийная воспроизводимость).

Правильность полученных результатов подтверждена данными метода мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA) в соответствии с Клиническими рекомендациями – Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q – 2023-2024-2025 (20.02.2023), ID: 593, утвержденными Минздравом РФ.

Показатели диагностических характеристик для исследуемых мишеней соответствуют значениям, приведенным в таблице 2.

Таблица 2.

Анализируемая мишень	Количество положительных образцов	Количество отрицательных образцов	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Участок 7 экзона гена SMN1	164	155	98,1% - 100%	98,2% - 100%

8. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

8.1. Требования безопасности при работе с набором

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 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-противоэпидемиологических (профилактических) мероприятий» и 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».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

IVD-TEST SMN

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

- Удалять неиспользованные реактивы 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 населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

ВНИМАНИЕ! При удалении пробирок, содержащих продукты ПЦР, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами II-IV групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

8.2. Требования охраны окружающей среды

Набор реагентов не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности. В том числе в случае отклонений в функционировании медицинского изделия, включая определяемые по внешним признакам.

Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.

Набор реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав набора не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. Реагенты, входящие в состав набора, безопасны для окружающей среды, не содержат цианид, а также другие вредные вещества.

Набор реагентов не содержит: лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсibilизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

9. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С." по ТУ 9443-004-51495026-2004 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия, ФСР 2010/07114).

2. Центрифуга "Фуга/вортекс Микро-Спин FV-2400" (Biosan, Латвия, ФС № 2005/518).

3. Дозаторы пипеточные Eppendorf Research Plus с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/11028).

IVD-TEST SMN

4. Наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных систем ("Эксиджен, Инк.", США, ФСЗ 2012/12077).
5. Одноразовые полипропиленовые тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 2,0 мл с плоской крышкой. Например, Изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro ("Эксиджен, Инк.", США, ФСЗ 2012/11892).
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Амплификатор детектирующий "ДТпрайм" по ТУ 9443-004-96301278-2010 в следующих модификациях: 4М1, 4М3, 4М6, 5М1, 5М3, 5М6, 6М1, 6М3, 6М6, 4Х1, 5Х1, 6Х1 (Регистрационное удостоверение ФСР 2011/10229)
9. Холодильник, поддерживающий температуру +4°C, например, ХМ-4424-000-N «ATLANT» (ЗАО «АТЛАНТ», Россия).
10. Холодильник, поддерживающий температуру -20°C, например Liebherr LGT 3725 (Liebherr, Австрия).
11. Набор реагентов для экстракции ДНК человека из сухих пятен крови и цельной крови «МагноПрайм® DrySpot» по ТУ 21.20.23-219-09286667-2023, ООО «НекстБио», Регистрационное удостоверение № РЗН 2024/22489

10. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

10.1. Материал для исследования

Материалом для исследования набором реагентов IVD-TEST SMN является **ДНК, выделенная из сухих пятен крови.**

Взятие, доставка и хранение клинических образцов

Для получения сухого пятна крови участок карты пропитывают капиллярной кровью, взятой из пятки новорождённого.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно Методическим рекомендациям «Метод получения сухого пятна крови на тест-бланк для проведения клинико-лабораторных исследований», 2022 г и Приложению № 2 приказа Минздравсоцразвития России от 22.03.2006 №185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания»

Клинический материал (капиллярная кровь) наносится на Карту для забора и транспортировки биологического материала, высушивается и доставляется в соответствии с Методическими рекомендациями «Метод получения сухого пятна крови на тест-бланк для проведения клинико-лабораторных исследований», 2022 г.

Транспортировка тест-бланков осуществляется при температуре не выше 25 °С.

Тест-бланк с 3 каплями крови хранится не менее 1 года при температуре не выше 25 °С после выдачи результатов всех скрининговых тестов. Тест-бланк с 5 каплями крови хранится не менее 3-х лет при температуре не выше 25 °С.

10.2. Предварительная обработка клинического материала

Предварительная обработка сухих пятен крови с целью выделения ДНК производится в точном соответствии с инструкцией по применению к Набору реагентов для экстракции ДНК человека из сухих пятен крови и цельной крови «МагноПрайм® DrySpot» по ТУ 21.20.23-219-09286667-2023, ООО «НекстБио», Регистрационное удостоверение № РЗН 2024/22489»

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 °С до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С в течение 6 месяцев и при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

10.3. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой

Присутствие в образце биологического материала ингибиторов ПЦР может вызвать сомнительные и неточные результаты исследования.

Среди потенциальных ингибиторов ПЦР могут быть обнаружены в образце биологического материала некоторые вещества естественного происхождения, такие как гемоглобин.

В таблице 2 указаны предельно допустимые остаточные концентрации концентрации потенциальных ингибирующих веществ в исследуемом препарате ДНК.

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

Потенциальные интерферирующие вещества	Концентрация потенциально интерферирующих веществ
Гемоглобин	200 μ M

11. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование препаратов нуклеиновых кислот, полученных из клинического материала с использованием набора реагентов IVD-TEST SMN включает следующие этапы:

1. Выделение ДНК из сухих пятен крови
2. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК методом ПЦР в реальном времени с последующей детекцией кривых плавления
3. Анализ и интерпретация результатов.

11.1. Постановка реакции амплификации исследуемых локусов нуклеиновых кислот

Исследование препаратов нуклеиновых кислот, полученных из клинического материала с использованием набора реагентов IVD-TEST SMN включает следующие этапы:

- Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК методом ПЦР в реальном времени с последующей детекцией кривых плавления
- Анализ и интерпретация результатов.

11.1. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК методом ПЦР в реальном времени с последующей детекцией кривых плавления

Для проведения этапа амплификации используются препараты нуклеиновых кислот в деионизованной воде, экстрагированные из клинического материала согласно рекомендациям, приведенным в настоящей Инструкции по применению.

Для внесения в пробирки реагентов, образцов нуклеиновых кислот и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы нуклеиновой кислоты – 10 мкл.

1) Приготовить мастер-микс в отдельной пробирке на необходимое количество исследований с учетом Контроля Норма, Контроля Патология и Отрицательного Контроля. Все контроли анализируются в двух повторах вне зависимости от количества исследуемых образцов.

IVD-TEST SMN

Компонент набора	Объем на одну реакцию, мкл	Объем на N реакций с учетом контролей, мкл
Реакционная смесь	10	$10 \times N + 10 \times 6 + 1$
Раствор активатора	5	$5 \times N + 5 \times 6 + 1$
Геномная ДНК	10	-

При одновременном проведении 96 исследований рекомендуется следующее распределение контрольных образцов в ПЦР плашке: Контроль Норма добавляется в лунки A1, F12; Контроль Патология добавляется в лунки B1, G12, Отрицательный контроль добавляется в лунки C1, H12.

После приготовления реакционной смеси тщательно перемешать ее на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

2) Внести в каждую пробирку/лунку по 15 мкл готовой реакционной смеси.

3) В пробирки/лунки с реакционной смесью, используя наконечники с фильтром, внести 10 мкл исследуемого препарата нуклеиновой кислоты. При постановке реакции с контрольными образцами (Контроль Норма, Контроль Патология и Отрицательный контроль) внести в пробирки (лунки плашки) с реакционной смесью 10 мкл исследуемого Контрольного образца.

4) Сбросить капли кратковременным центрифугированием пробирки (плашки)

5) Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 3).

Таблица 3. Программа амплификации IVD-TEST SMN

Шаг программы	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
1	95	3 мин	1
2	95	15 сек	45
	60	15 сек	
	68	30 сек	
3	30	3 мин	1
4	От 30 до 65 с шагом 0.5		Кривая плавления, детекция флуоресценции

6) Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

7) Запустить выполнение программы амплификации.

8) По окончании выполнения программы приступить к этапу Анализа и интерпретации данных.

IVD-TEST SMN

1. Предварительная настройка прибора

Предварительная настройка Амплификатора детектирующего "ДТпрайм" по ТУ 9443-004-96301278-2010 в следующих модификациях: 4М1, 4М3, 4М6, 5М1, 5М3, 5М6, 6М1, 6М3, 6М6, 4Х1, 5Х1, 6Х1 (Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/10229) включает создание пользовательских протоколов для проведения исследования (**Тест**).

Создание Теста

Перейти в раздел Тест в программе RealTime_PCR.

В разделе Тест нажать кнопку Создать новый тест. Ввести название IVD-TEST SMN. В открывшемся окне указать необходимые параметры:

1. Анализ. Тип: Качественный. Метод: Геометрический (Cp)
2. Пробирки: Образец, Контроль +, Контроль –
3. Стандарты. Не заполняется
4. Контроли. Положительный (К+): 4. Отрицательный (К-): 2.
5. Объем рабочей смеси в пробирке: 25 мкл
6. Флуорофоры: FAM – специфика
7. Параметры анализа полиморфизмов. Не заполняется.

Тест: IVD-TEST SMN

Описание:

Параметры:

1. Анализ: Тип: Качественный, Метод: Геометрический (Cp)

2. Пробирки: образец, контроль-, стандарт, контроль+

3. Стандарты: Количество: 4, Дубли: 2

5. Объем рабочей смеси в пробирке: 25 мкл

6. Флуорофоры: Fam, Hex, Rox, Cy5, Cy5.5

7. Параметры анализа полиморфизмов: Гетерозигота dCp < 2.0, Гомозигота dCp > 5.0

8. Программа амплификации: IVD-TEST SMN

1. 95.0 °C - 0:03:00

2. 95.0 °C - 0:00:15, 60.0 °C - 0:00:15, 68.0 °C - 0:00:30 } x 45

3. 30.0 °C - 0:03:00

4. 30.0 °C - 0:00:15

Дополнительно Ok Отмена

Рисунок 1 Параметры при создании Теста

IVD-TEST SMN

8. Программа амплификации. Нажать на кнопку Создать новую программу амплификации. В открывшемся окне указать имя программы IVD-TEST SMN, параметры цикла амплификации (см. рисунок 2).

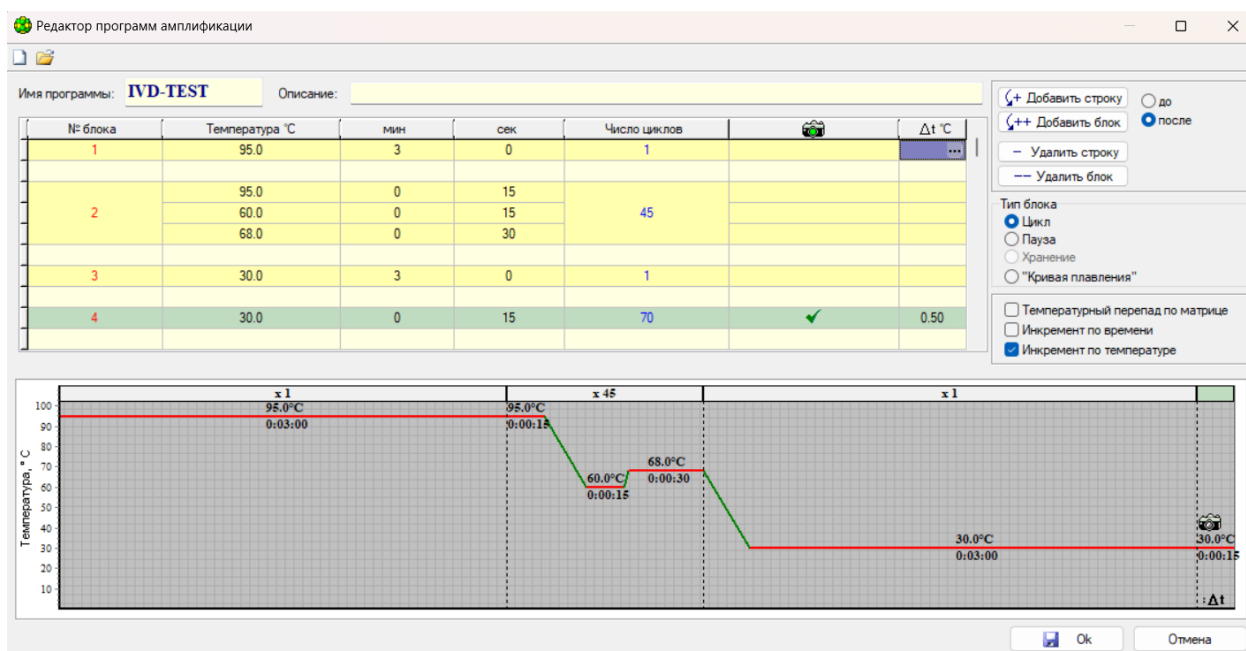


Рисунок 2 Редактор программы амплификации

В настройках шага 4 (Кривая плавления) указать $T_0 = 30\text{ °C}$, $T_k = 65\text{ °C}$, $dT = 0.5\text{ °C}$. Нажать применить (см рисунок 3)

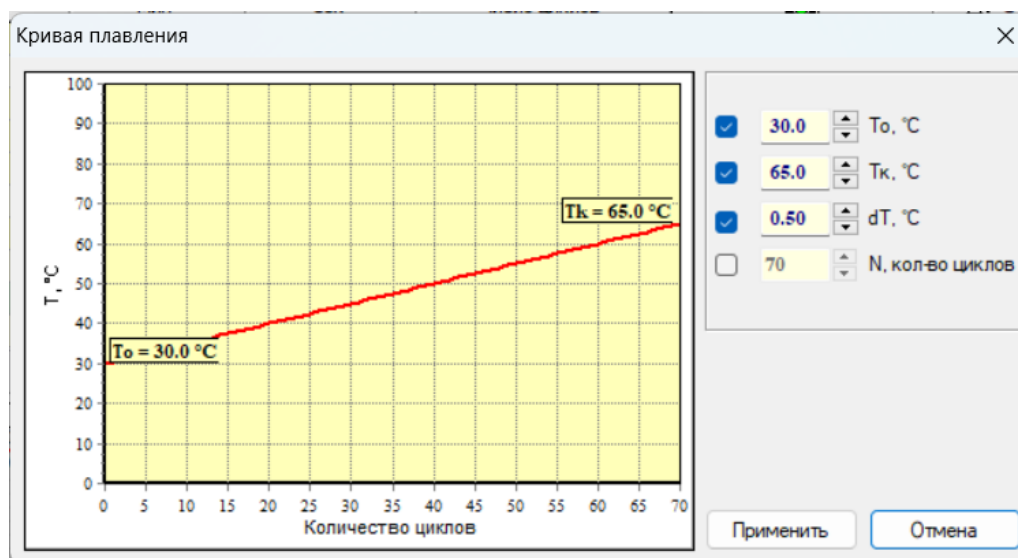
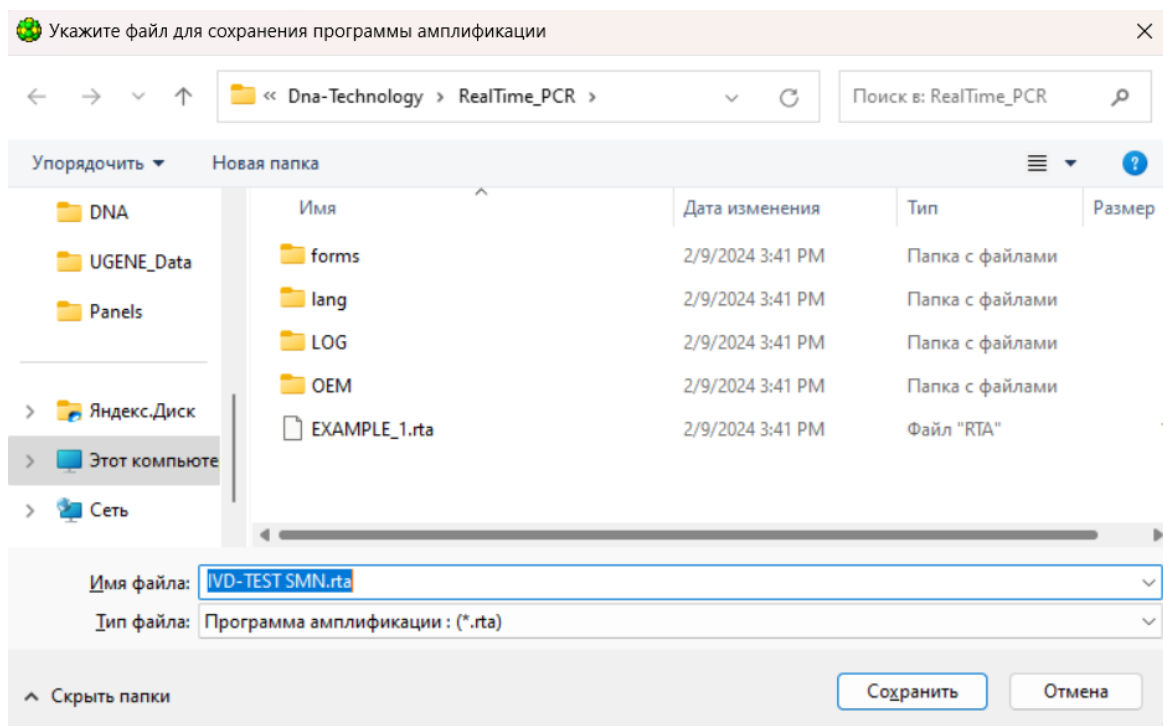


Рисунок 3 Параметры кривой плавления

В редакторе программы амплификации нажать кнопку Ок. В открывшемся диалоговом окне выбрать папку для сохранения программы амплификации, нажать Сохранить

IVD-TEST SMN

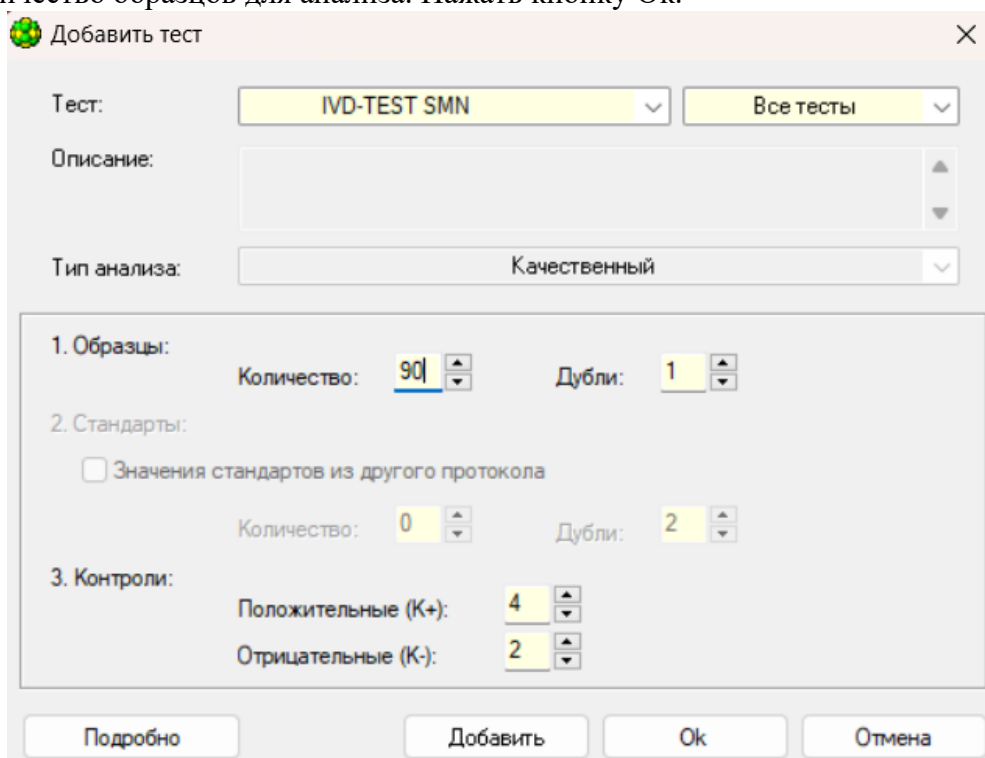


После сохранения в Тесте должна отображаться программа амплификации. Нажать кнопку Ок.

2 Запуск прибора

Проведение исследования проводится на Амплификаторе детектирующем "ДТпрайм" по ТУ 9443-004-96301278-2010 в следующих модификациях: 4М1, 4М3, 4М6, 5М1, 5М3, 5М6, 6М1, 6М3, 6М6, 4Х1, 5Х1, 6Х1 (Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/10229) в соответствии с инструкцией пользователя, предоставляемой производителем.

В главном меню нажать кнопку Добавить тест. В открывшемся диалоговом окне выбрать количество образцов для анализа. Нажать кнопку Ок.



IVD-TEST SMN

В таблице образцов указать Идентификатор каждого образца. Указать Контроли Норма, Контроли Патология и Отрицательные Контроли в соответствии с Инструкцией.

Затем нажать кнопку Применить, проверить правильность введенных параметров, нажать кнопку Запуск программы.

12. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

12.1. Детекция результатов


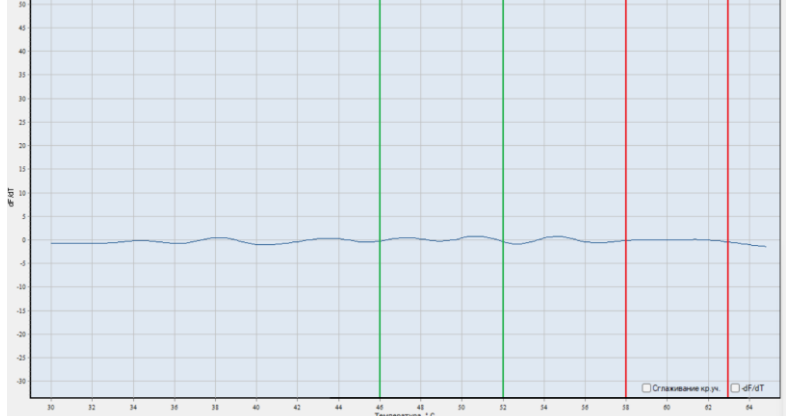
Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется прибором автоматически. На основании этих данных управляющая программа строит кривые плавления дуплексов флуоресцентные зонды – ПЦР-продукт.

12.2. Интерпретация результатов

Анализируют кривые плавления дуплексов флуоресцентные зонды – ПЦР-продукт по каналу детекции Fam. Регистрируется сигнал исследуемых маркеров в диапазоне температур от 30 до 65 °С. Алгоритм интерпретации результатов приведен в Таблице.

Варианты кривых плавления, которые могут встречаться	Описание кривой плавления	Результат исследования клинических образцов
		Варианты нормы
	Наличие сигнала в области 46 – 52 °С (отмечена зелеными линиями), наличие сигнала в области 58 – 63 °С (отмечена красными линиями)	Отсутствие делеции 7 экзона гена SMN1
	Отсутствие сигнала в области 46 – 52 °С (отмечена зелеными линиями), наличие сигнала 58 – 63 °С (отмечена красными линиями)	Отсутствие делеции 7 экзона гена SMN1
		Вариант патологии

IVD-TEST SMN

	<p>Наличие сигнала в области 46 – 52 °С (отмечена зелеными линиями), отсутствие сигнала 58 – 63 °С (отмечена красными линиями)</p>	<p>Наличие делеции 7 экзона гена SMN1</p>
		<p>Результат не подлежит учету</p>
	<p>Отсутствие сигнала в области 46 – 52 °С (отмечен зелеными линиями), отсутствие сигнала 58 – 63 °С (отмечен красными линиями)</p>	<p>Полное отсутствие белка SMN, которое произойдет при отсутствии как SMN1, так и SMN2, несовместимо с жизнью, что делает такое событие крайне маловероятным. Невозможно интерпретировать результаты исследования в связи с отсутствием материала исследования или нарушений условий проведения исследования</p>


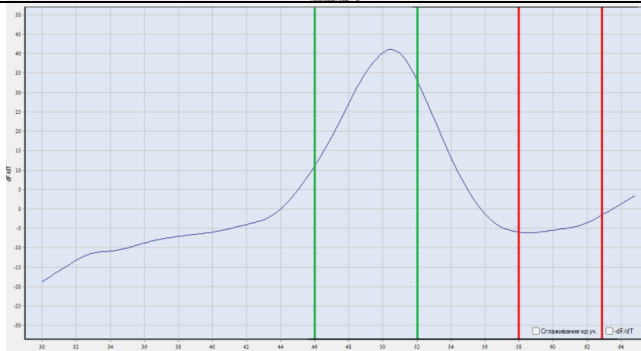
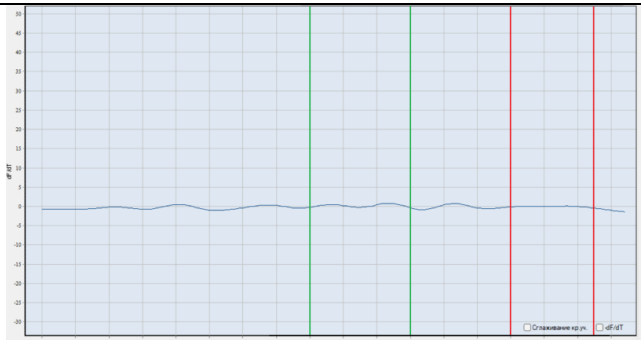
* - Наличие или отсутствие сигнала в области 46 – 52 °С (отмечен зелеными линиями), что свидетельствует о наличии/отсутствии делеции SMN2 - не является клинически значимым, в связи с чем не учитывается при интерпретации результатов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены ожидаемые результаты для образцов Контроль Норма, Контроль Патология и Отрицательный

IVD-TEST SMN

контроль, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 5).

Таблица 5. Результаты оценки контрольных реакций

Варианты кривых плавления	Контрольный материал	Описание кривой плавления
	<p>Наличие кривой плавления с максимумом в области 58 – 63 °С Наличие сигнала в области 46 – 52 °С</p>	<p>Контроль Норма</p>
	<p>Отсутствие кривой плавления с максимумом в области 58 – 63 °С Наличие сигнала в области 46 – 52 °С</p>	<p>Контроль Патология</p>
	<p>Отсутствие кривой плавления с максимумом в области 58 – 63 °С Отсутствие сигнала в области 46 – 52 °С</p>	<p>Отрицательный контроль</p>

* - Положительный контроль представляет собой раствор, содержащий синтетические мишени исследуемых в наборе ДНК-копий целевых фрагментов генов SMN1, SMN2. Не смотря на отсутствие клинической значимости наличия/отсутствия сигнала в области 46 – 52 °С, мишень SMN2 присутствует в контрольном материале для достижения наибольшей схожести с клиническим образцом.

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

- Если результаты анализа в образцах Контроль Норма, Контроль Патология и Отрицательный контроль не соответствуют ожидаемым, приведенным в Таблице 5. Возможная причина: ошибки при постановке полимеразной цепной реакции.

- Если отсутствует сигнал амплификации (Отсутствие кривой плавления с максимумом в области 58 – 63 °С и отсутствие сигнала в области 46 – 52 °С). Возможная причина: ошибки при постановке полимеразной цепной реакции. Необходимо провести повторную постановку реакции полимеразной цепной реакции.

13. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

13.1. Условия хранения

Набор реагентов IVD-TEST SMN должен храниться в защищенном от света месте при температуре от -25°C до -20°C в течение всего срока годности. Срок годности Наборов – 18 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

13.2. Транспортирование

Набор реагентов IVD-TEST SMN транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств.

Допускается транспортирование набора реагентов всеми видами крытого транспорта при температуре от 0 °C до плюс 25 °C не более 5 суток.

14. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии СанПиН 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».

Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Отходы биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные отходы) из клинико-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, образцы материала после пробоподготовки и отходы после проведения анализа относятся к классу Б (эпидемически опасные отходы) в соответствии с СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

15. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

IVD-TEST SMN

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 121205, г. Москва, б-р Большой (инновационного центра Сколково тер.), д. 42, стр. 1, эт. 1, пом. 337, тел./факс (499) 670-40-41, email: gordiz@gordiz.ru

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

16. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора IVD-TEST SMN, следует обращаться в ООО «ГОРДИЗ» по адресу: 121205, г. Москва, б-р Большой (инновационного центра Сколково тер.), д. 42, стр. 1, эт. 1, пом. 337, тел./факс (499) 670-40-41, email: gordiz@gordiz.ru

17. ПЕРЕЧЕНЬ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ

	Названия документов
Приказ МЗ РФ №4н от 06.06.2012	Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий
ГОСТ 2.114-2016	Единая система конструкторской документации. Технические условия.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации
ГОСТ 31508-2012	Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Методы испытаний.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023	Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования
ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003)	Лаборатории медицинские. Требования безопасности.
ГОСТ 3885-73	Реактивы и особо чистые вещества. Правила приемки, отбор проб, фасовка и маркировка.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i> .
ГОСТ Р 58 577- 2019	«Правила установления допустимых выбросов загрязняющих веществ промышленными предприятиями»
ГОСТ 17.2.3.01-1986	Охрана природы. Атмосфера. Правила контроля качества воздуха населенных пунктов
ГН 2.1.6.3492-17	Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе городских и сельских поселений.
СанПиН 3.3686-21	Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней
СанПиН 2.1.3684-21	СанПиН 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»
МУ 1.3.2569-09	Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2024	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2024	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального использования.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно!
Обратитесь к инструкции по применению



Код партии



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Верхнее ограничение температуры



Дата изготовления



Изготовитель