

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления фрагмента Y хромосомы плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени

Пол плода

Фасовка стандартная (S)

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2017/6242 от 12 сентября 2017 года

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1 НАЗНАЧЕНИЕ	6
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.....	6
2.1 Состав набора реагентов	6
2.2 Описание реагентов	7
2.3 Количество анализируемых проб	7
2.4 Принцип метода	7
2.5 Время проведения анализа.....	8
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	9
3.1 Специфичность анализа	9
3.2 Чувствительность анализа	9
3.3 Диагностические характеристики	9
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	9
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	11
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	12
6.1 Материалы для исследования	12
6.2 Транспортировка и хранение исследуемого материала	12
6.3 Получение плазмы крови.....	12
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	13
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	13
7.2 Подготовка и проведение ПЦР	13
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	15
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР	15
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	19
10.1 Транспортирование	19
10.2 Хранение.....	19
10.3 Указания по эксплуатации	19
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	19
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	20
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	20
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА.....	20
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	21
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ.....	21
Приложение 1	23

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
КВМ	- контроль взятия материала
К+	- положительный контрольный образец
К-	- отрицательный контрольный образец

ВВЕДЕНИЕ

Выяснение пола плода в первом – начале второго триместра может предотвратить случаи рождения больных детей в семьях с отягощённой наследственностью. Возможно прерывание беременности по медицинским показаниям при наличии у родителей носительства генов заболеваний, сцепленных с полом (например, гемофилия или прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна/Беккера – у матери). Также врачу важно знать пол плода для принятия решения о возможности гормональной терапии беременной в случае наличия у пациентки гиперандрогении надпочечникового генеза (врождённая дисплазия коры надпочечников, ВДКН) или других маскулинизирующих эндокринных заболеваниях.

Основным методом пренатального установления пола будущего ребенка сегодня является ультразвуковая диагностика, однако на ранних сроках беременности этот метод не всегда корректен и часто субъективен. Выявление фрагмента Y хромосомы в кровотоке матери с высокой достоверностью свидетельствует о беременности плодом мужского пола.

Научное обоснование

Показания к проведению исследования:

Наличие у беременных женщин маскулинизирующих эндокринных заболеваний, в том числе врожденной дисфункции коры надпочечников (ВДКН), для коррекции проведения лекарственной терапии.

При возможном носительстве женщинами генов гемофилии и других заболеваний, сцепленных с полом (умственная отсталость, связанная с X-хромосомой; миодистрофия; адренолейкодистрофия; синдром Альпорта; иммунодефицит, связанный с X-хромосомой; пигментный ретинит; гидроцефалия, связанная с X-хромосомой; синдром Лоу; X-связанный ихтиоз), особенно если ранее уже родился ребенок, имеющий подобное заболевание.

Предполагаемые нарушения детерминации пола плода по результатам УЗИ.

Противопоказания к проведению исследования:

1. Трансплантация органов и тканей от донора мужского пола.
2. Инверсия пола с наличием Y хромосомы у матери (в том числе мозаичные формы).
3. Исследование не рекомендовано при сроке беременности менее 8 эмбриологических или 10 акушерских недель, так как возможно получение некорректных результатов.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1** Настоящая инструкция распространяется на набор реагентов для выявления фрагмента Y хромосомы плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени Пол плода.
- 1.2** Набор реагентов для выявления фрагмента Y хромосомы плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени Пол плода предназначен для обнаружения мультикопийного фрагмента Y хромосомы плода в крови беременной женщины методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.
- 1.3** Функциональное назначение: набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (обнаружения фрагмента Y хромосомы плода в крови беременной женщины).
- 1.4** В качестве биологического материала используют периферическую кровь.
- 1.5** Набор может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.
- 1.6** Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.
- 1.7** Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Состав набора реагентов

Набор реагентов Пол плода выпускают в стандартной фасовке со смесью для амплификации в стрипах (маркируется - фасовка S, стрипы) или со смесью для амплификации в пробирках (маркируется - фасовка S, пробирки).

REF R1-H803-S 3/9, Фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл в пробирке
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	75 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

REF R1-H803-23/9, Фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок	по 20 мкл в пробирке
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	75 мкл

2.2 Описание реагентов

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

2.3 Количество анализируемых проб

Набор реагентов, включающий 96 пробирок, предназначен для одноразового применения и рассчитан на проведение 48 определений (не более 46 неизвестных образцов в двух повторах каждый, отрицательного контрольного образца (в трёх повторах) и положительного контрольного образца).

2.4 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный мультиплексный анализ.

В основе работы наборов реагентов лежит принцип амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров комплементарных специфическому участку ДНК и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в реакционную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

Набор реагентов Пол плода включает: смесь для амплификации, специфичную для определения наличия мультикопийного фрагмента Y хромосомы и геномной ДНК человека (КВМ). КВМ используется для анализа качества выделения и позволяет определить, достаточно ли полученного количества ДНК для исследования. Расчёт результатов исследования основан на оценке значений C_r индикаторных циклов исследуемых мишеней.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации мультикопийного фрагмента Y хромосомы, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продуктов амплификации KBM, входит флуоресцентный краситель Hex.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке. В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации и ДНК-мишени, определяемые набором.

Таблица 1 – Перечень ДНК-мишеней, определяемых набором, и каналов детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Фрагмент Y хромосомы	KBM	-	-	-

Исследование с использованием набора реагентов состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК-ФЕТ и ПЦР-амплификация в режиме реального времени с использованием набора реагентов Пол плода.

Для проведения ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени используют амплификаторы детектирующие (ООО «НПО ДНК-Технология») «ДТпрайм», «ДТлайт» и «ДТ-96» со специальным программным обеспечением.

2.5 Время проведения анализа (без учета пробоподготовки): от 2 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1 Специфичность анализа

В результате амплификации образца фетальной ДНК, выделенной из крови беременной женщины и не содержащей фрагмент Y хромосомы, должны регистрироваться отрицательный результат по каналу Fam, но положительный по каналу Hex. В этом случае пол плода – женский.

В результате амплификации образца фетальной ДНК, содержащей фрагмент Y хромосомы, должны регистрироваться положительные результаты по каналам Fam и Hex. В этом случае пол плода – мужской.

Интерпретация результатов анализа проводится автоматически с помощью программного обеспечения к прибору (см. приложение 1).

3.2 Чувствительность анализа

Чувствительность набора при использовании комплекта реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери ПРОБА-НК-ФЕТ составляет 150 копий геномной ДНК (суммарной ДНК матери и плода) в 1,0 мл исследуемого образца плазмы крови.

Количество анализируемой суммарной ДНК матери и плода должно быть не менее 0,1 нг на амплификационную пробирку, что приблизительно соответствует $C_p \leq 35,0$ на канале детекции КВМ (Hex). При использовании меньшего количества ДНК ($C_p > 35,0$ на канале детекции КВМ) будут получены недостоверные результаты.

3.3 Диагностические характеристики

Диагностическая чувствительность 100 % (92-100) %.

Диагностическая специфичность 100 % (90-100) %.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические ПЦР исследования клинического материала с соблюдением 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», требований ГОСТ Р 52905 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

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

При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом

соответствии с СП 1.3.2322-08 и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Использовать только новые наконечники и пробирки.

Экстракцию ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Приготовление реакционной смеси возможно проводить в ПЦР-боксах.

Этап ПЦР в реальном времени следует проводить в помещении, снабженном комплектами полуавтоматических или автоматических дозаторов, халатами и прочими принадлежностями.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение 30 минут.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор. Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергаются влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.

При использовании набора в клинично-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Не допускается использовать набор реагентов:

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

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий («ДТпрайм»¹, «ДТлайт»² или «ДТ-96» производства ООО «НПО ДНК-Технология»);
- микроцентрифуга-вортекс, например, BioSan, Латвия или аналогичная;
- холодильник бытовой Стинол, Россия или аналогичный;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия или аналогичные;
- дозаторы механические или электронные переменного объема одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 2 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл, например, Eppendorf, Германия или аналогичные;
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл, например, Ахуген, США или аналогичные;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;

Для взятия и предобработки материала для исследования и выделения ДНК:

- бокс биологической безопасности II класса;
- комплект реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери (ПРОБА-НК-ФЕТ производства ООО «ДНК-Технология ТС»);
- центрифуга для пробирок объемом 4,5 мл, с RCF не ниже 1150 x g, например, центрифуга EBA 20 Hettich (3461g или 6000 об/мин);
- центрифуга для пробирок объемом 1,5 мл, с RCF не ниже 17000 x g, например, центрифуга HERAEUS pico17 (17000 g или 13300 об/мин);
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 65 °С до 98 °С;
- вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette с ЭДТА.

Программное обеспечение для детектирующих амплификаторов:

- версия ПО не ниже 7.7.5.23³;
- файл с параметрами анализа «Gender.ini».

¹ - только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6

² - только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2

³ - производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»:

<https://www.dna-technology.ru/poequip/po-dlya-oborudovaniya>

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материалы для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

ВНИМАНИЕ! Срок беременности пациентки должен составлять не менее 8 эмбриологических или 10 акушерских недель.

Взятие цельной периферической крови

Необходимый объем крови составляет 4,0 - 4,5 мл. Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объемом 4,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2–3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина и цитрата натрия в качестве антикоагулянта.

6.2 Транспортировка и хранение исследуемого материала

Рекомендуется начать обработку крови в первые два часа после ее взятия.

В случае невозможности проведения обработки крови в течение 2 часов допускается её хранение при температуре от 18 °С до 25 °С не более 4-8 часов.

6.3 Получение плазмы крови

Центрифугируйте пробирки с кровью при 1000 - 2000 x g в течение 20 мин при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

Промаркируйте необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл (две для каждого исследуемого образца).

Не задевая нижнюю (клеточную) фракцию, отберите автоматическим дозатором по 900 мкл верхней фракции (плазма) и перенесите в две промаркированные пробирки.

ВНИМАНИЕ! Для выделения ДНК используется только **одна** пробирка! Вторая пробирка может быть заморожена при минус 20 °С или ниже, при необходимости, используется для повторного выделения ДНК.

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

При планировании выделения фетДНК на следующий день или позже, пробирки с плазмой необходимо заморозить при минус 20 °С или ниже. Замороженная плазма может храниться не более 3 месяцев. Перед началом выделения по одной пробирке каждого образца необходимо разморозить при комнатной температуре.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов ПРОБА-НК-ФЕТ, производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия.

ВНИМАНИЕ! При использовании наборов для выделения фетДНК других производителей, могут быть получены некорректные результаты.

Одновременно с выделением ДНК из периферической крови необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец, входящий в состав комплекта реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери (ПРОБА-НК-ФЕТ), в объеме согласно инструкции к набору реагентов для выделения ДНК.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР

ВНИМАНИЕ! Так как фетальная ДНК находится в крови беременной женщины в минимальном количестве, анализ каждого образца ДНК необходимо проводить в дублях. В противном случае могут быть получены некорректные результаты.

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.2.1 Промаркируйте по две пробирки стрипов (или по две отдельные пробирки) со смесями для амплификации для каждого исследуемого образца, одну для положительного контрольного образца (К+), и три для отрицательного контрольного образца (К-).

Например: необходимо проанализировать два образца. Нужно промаркировать восемь пробирок – четыре для исследуемых образцов, одну для К+ и три для К- (см. таблицу 2).

Т а б л и ц а 2 – Пример маркировки пробирок для проведения ПЦР

Образец 1	Пробирки 1 - 2
Образец 2	Пробирки 3 - 4
К+	Пробирка 5
К-	Пробирки 6 - 8

7.2.2 Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы в течение 3-5 сек и центрифугируйте в течение 1-3 сек на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Внесите в промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы.

7.2.4 Внесите в промаркированные пробирки по одной капле (приблизительно 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки стрипов или пробирок.

7.2.5 Встряхните пробирки с полученными препаратами ДНК и контрольными образцами в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге-вортексе.

- 7.2.6 Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа (или только той пробирки), в который будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.
- 7.2.7 Внесите, не повреждая слой парафина по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (2 шт. для каждого образца). В пробирки маркированные К+ и К- ДНК не вносятся.
- 7.2.8 Внесите, не повреждая слой парафина по 5,0 мкл положительного контрольного образца в пробирку, маркированную К+. Внесите, не повреждая слой парафина по 5 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК в пробирки, маркированные К- (всего 3 шт.).
- 7.2.9 Закройте крышки стрипов (пробирок). Центрифугируйте стрипы (пробирки) в течение 1-3 сек на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.10 Установите все стрипы (пробирки) в блок детектирующего амплификатора.
- 7.2.11 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR, в режиме «Работа с прибором», загрузите файл "Gender.ini", добавьте в протокол тест «Gender», укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. п. 7.2.8) и проведите ПЦР. При выборе теста «Gender» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов необходимо уточнить программу амплификации у представителя компании «ДНК-Технология».

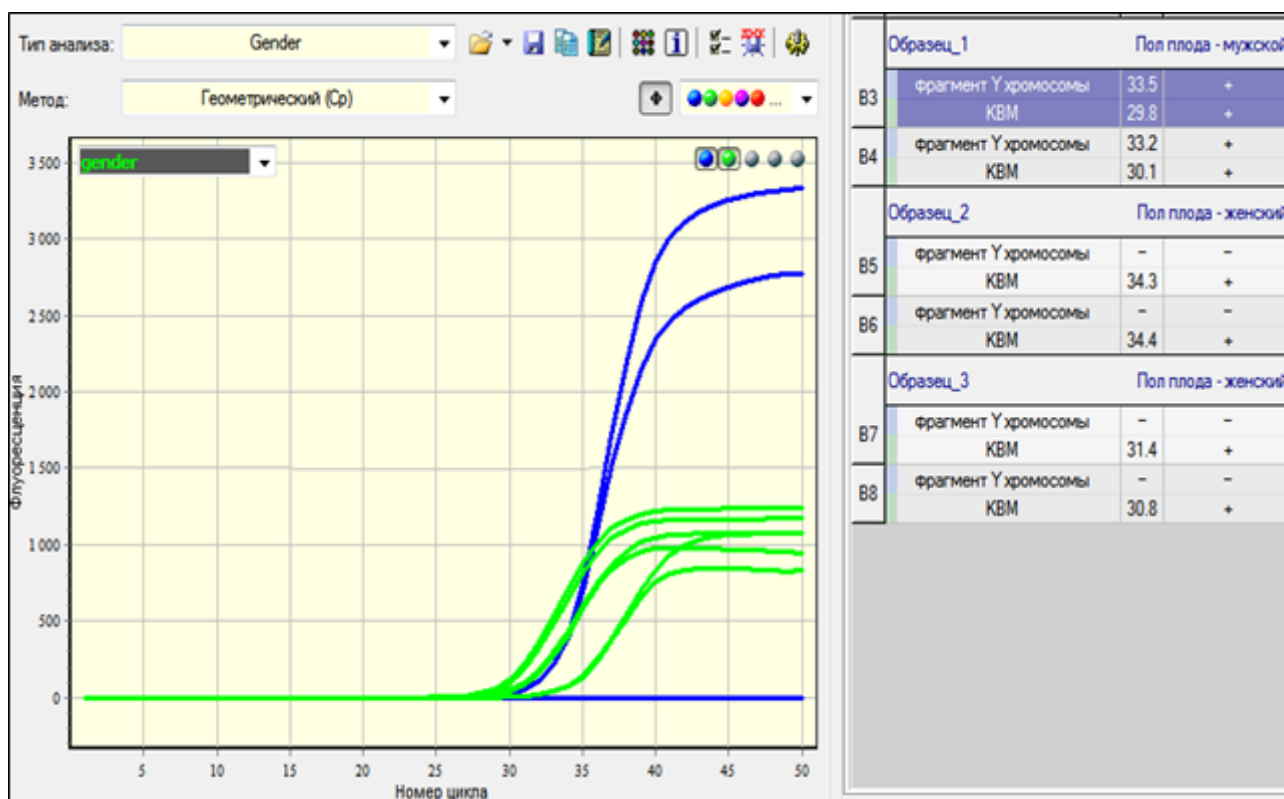
Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТлайт», «ДТпрайм» и «ДТ-96»

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5	√	Цикл
	64	0	15			
3	94	0	10	45	√	Цикл
	64	0	15			
4	94	0	5	1		Цикл
5	10	хранение		хранение

Тесты (ini файлы) для приборов «ДТпрайм», «ДТлайт» и «ДТ-96» предоставляются производителем набора реагентов.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

- 8.1 Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.
- 8.2 Детекция и учёт результатов осуществляются амплификатором детектирующим автоматически.
- 8.3 После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов. Анализ проводится автоматически программным обеспечением.
- 8.4 На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла по всем используемым каналам для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторные циклы по двум каналам (Ср) и результат исследования по дублям. Пример выдачи результатов прибором:



По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР

- 9.1 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.
- 9.2 Результат исследования для каждого образца определяется программным обеспечением автоматически с учётом значений Ср по каналу Fam (специфический фрагмент Y хромосомы) и по каналу Hex (KVM) в совокупности по дублям для этого образца (см. Приложение 1).

- 9.3** В образцах, прошедших ПЦР и содержащих достаточное количество ДНК, для которых получены корректные значения C_p , программа определяет генотип исследуемого образца, который отображён в таблице в графе «Результат». В этом случае выдается заключение по результатам исследования.
- 9.4** В случае многоплодной беременности результат исследования «пол плода – женский» будет означать, что все плоды женского пола, а результат «пол плода – мужской» - что хотя бы один плод мужского пола.
- 9.5** Для образцов с недостаточным для анализа количеством ДНК ($C_p > 35,0$ на канале детекции КВМ), некорректными значениями C_p , или при несовпадении результатов по дублям, программа определяет сомнительные или недостоверные результаты, в графе "Результат" будет указано соответственно "?" или "нд". В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).
- 9.6** Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены результаты, приведенные в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты исследования для отрицательных и положительных контрольных образцов

Внесенный материал	Выбранный флуорофор	
	Fam (фрагмент Y хромосомы)	Hex (КВМ)
«К+»	$C_p \leq 35$	$C_p \leq 35$
«К-» (3 повтора)	C_p не указан или > 39	C_p не указан или > 39

- 9.7** При получении для отрицательного контрольного образца результатов, отличающихся от значений, указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.
- 9.8** При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от значений, указанных в таблице 4, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

Ниже представлены варианты результатов исследования и бланки ответа:

Образец 4, результат исследования «Пол плода – женский».

№	Исследование	Ср	Результат
	Образец_4		Пол плода - женский
G8	фрагмент Y хромосомы	-	-
	KVM	33.0	+
H8	фрагмент Y хромосомы	-	-
	KVM	33.4	+

Бланк ответа⁴

Пренатальная диагностика.

Пол плода.

Дата
 Номер пробирки
 Ф.И.О. пациента
 Пол
 Возраст
 Организация
 Врач
 Примечание

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: Образец_4

Название исследования	Результат	Интерпретация результата
Выявление фрагмента Y хромосомы	Не выявлен	Пол плода - женский.

Внимание: Данное исследование проводится при сроке беременности более 8 недель.

Исследование выполнил: _____ Дата: _____
 Подпись: _____

⁴ - для срока беременности более 8 эмбриологических или 10 акушерских недель

Образец 3, результат исследования «Пол плода – мужской».

№	Исследование	Ср	Результат
	Образец_3		Пол плода - мужской
E8	фрагмент Y хромосомы	32.7	+
	KVM	33.6	+
F8	фрагмент Y хромосомы	32.5	+
	KVM	33.2	+

Бланк ответа⁵

Пренатальная диагностика.

Пол плода.

Дата
 Номер пробирки
 Ф.И.О. пациента
 Пол
 Возраст
 Организация
 Врач
 Примечание

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: Образец_3

Название исследования	Результат	Интерпретация результата
Выявление фрагмента Y хромосомы	Выявлен	Пол плода - мужской.

Внимание: Данное исследование проводится при сроке беременности более 8 недель.

Исследование выполнил: _____ Дата: _____
 Подпись: _____

⁵ - - для срока беременности более 8 эмбриологических или 10 акушерских недель

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора осуществляют в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов, входящих в состав набора.

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

10.2 Хранение

10.1.3 Набор реагентов следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

10.1.4 Смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора.

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

10.3 Указания по эксплуатации

10.1.6 Набор должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению.

10.1.7 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках;
- смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе, в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

11.2 При использовании набора в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

11.3 Входящие в состав набора реагентов жидкие компоненты, пришедшие в непригодность, перед сливом в канализацию должны быть предварительно разбавлены водой 1:100.

11.4 Упаковка набора реагентов (первичная: пробирки, флаконы и внешняя: пакеты полиэтиленовые с замком и коробки картонные) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

ВНИМАНИЕ! В случае вскрытия упаковки набора в боксе она относится к отходам класса Б и подлежит утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

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

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Каталожный номер
	Количество тестов		Адрес изготовителя
	Годен до		Не допускается воздействие солнечного света
	Серия набора		Не стерильно
	Дата изготовления		Одноразовое использование

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

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

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

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

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

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

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*.

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

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

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

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001:2008 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и EN ISO 13485:2012 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС»; ООО «ДНК-Технология ТС», Россия.

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

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

Рекламации по вопросам качества набора реагентов Пол плода, следует направлять по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, к.6, этаж 5, комн.14, тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru
Служба клиентской поддержки: 8 (800) 200-75-15 (звонок по России бесплатный),
E-mail: hotline@dna-technology.ru

**Принципы вычисления и интерпретации результатов исследования
программным обеспечением**

ВНИМАНИЕ! Анализ проводится программным обеспечением автоматически. Изложенные в данном приложении принципы вычисления результатов носят информативный характер и **не предназначены** для проведения пользователями самостоятельных расчетов.

Расчёт результатов исследования основан на оценке значений Ср индикаторных циклов исследуемых мишеней.

Принципы интерпретации результатов исследования

Значение Ср по каналу Fam	Результат по каналу Fam	Значение Ср по каналу Hex	Результат по каналу Hex	Интерпретация результата
Ср ≤ 35	+	Ср ≤ 35	+	Пол плода - мужской
Ср не указан* или > 37	-	Ср ≤ 35	+	Пол плода - женский

Примечание – Результаты в дублях для каждого образца должны совпадать качественно (наличие или отсутствие сигнала флюоресценции в интервалах Ср, указанных в таблице).

ДНК-Технология

117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6, этаж 5, комн.14

Тел./факс +7 (495) 640-17-71

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный)

E-mail: hotline@dna-technology.ru