

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«16» сентября 2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для выделения свободно циркулирующей
ДНК из плазмы крови (ДНК-Плазма-М-RT)
по ТУ 21.20.23-010-97638376-2017

Содержание

Введение.....	3
1. Назначение	5
2. Принцип метода.....	6
3. Состав набора реагентов	6
4. Характеристики набора реагентов	7
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «ДНК-Плазма-М-RT»	10
6. Меры предосторожности при работе с набором	10
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором	13
8. Анализируемые пробы.....	14
9. Подготовка компонентов набора для исследования	18
10. Проведение исследования	19
11. Возможные проблемы и их решение	21
12. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации набора.....	22
13. Утилизация.....	23
14. Гарантийные обязательства, контакты	24
Приложение А.....	25

Введение

Целевой анализ. Набор реагентов «ДНК-Плазма-M-RT» используется на этапе пробоподготовки к последующему анализу. Определение получаемой ДНК человека в качестве целевого анализа не предусмотрено.

Научная обоснованность.

Выделение ДНК - важный шаг подготовки проб. Многие методики, такие как амплификация, проведение обратной транскрипции, детектирование накопления продуктов амплификации методом ПЦР в реальном времени и т. д., не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах без предварительной очистки нуклеиновых кислот.¹

Выделение ДНК необходимо для генетического анализа, который используется для научных, медицинских целей. В медицинской практике используется для диагностики наследственных заболеваний, выявления риска развития различных наследственных болезней.

Свободно циркулирующие ДНК – это двухцепочечные низкомолекулярные молекулы геномной ДНК, фрагментированные на короткие (70-200 пар оснований) и длинные (до 21 тыс. пар оснований) отрезки, устойчивые к РНКазам и протеиназам, но расщепляемые с помощью ДНКазы. Есть два возможных источника сцДНК: пассивное высвобождение посредством клеточной смерти (апоптоз и некроз) и активное высвобождение путем клеточной секреции².

Свободно циркулирующие нуклеиновые кислоты (сцНК) в плазме или сыворотке крови, полученные после этапа выделения, являются чрезвычайно ценным объектом последующего молекулярно-генетического анализа.

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика.

¹ Антонова, О.С., Корнева, Н.А., Белов, Ю.В., Курочкин, В.Е. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии. Обзор. // Научное приборостроение. – 2010. - Том 20, №1. - С. 3-9.

² Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. Циркулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике / С.Н. Тамкович, В.В. Власов, П.П. Лактионов // Молекулярная биология. - 2008. - Т. 42, № 1. - С. 12-23.

Показания и противопоказания к применению.

Показания к применению: Набор реагентов «ДНК-Плазма-М-RT» рекомендуется использовать для выделения свободно циркулирующей ДНК (сцДНК) из плазмы периферической венозной крови человека для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени.

Противопоказания к применению: отсутствуют.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «ДНК-Плазма-М-RT» предназначен для выделения свободно циркулирующей ДНК (сцДНК) из плазмы периферической венозной крови человека методом, основанном на обратимом связывании нуклеиновых кислот на поверхности магнитных частиц, для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике при исследовании методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени.

Функциональное назначение: Набор реагентов «ДНК-Плазма-М-RT» предназначен для обеспечения преаналитической стадии анализа, и выделенная из плазмы крови человека свободно циркулирующая ДНК (сцДНК) не является основой для постановки диагноза, но может использоваться для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике, в частности в области пренатальной диагностики и онкологии, при исследовании методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени.

Например, при последующем проведении аллель-специфической ПЦР могут совместно применяться следующие медицинские изделия:

- Набор реагентов для определения статуса мутаций гена EGFR методом ПЦР-РВ (Тест-EGFR) по ТУ 9398-004-97638376-2015 в исполнениях: 1) «Тест-EGFR-12» на 12 определений, 2) «Тест-EGFR-24» на 24 определения, производства ООО «ТестГен» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2017/6267 от 19 сентября 2017 года),

- Диагностические наборы для идентификация ДНК плода в крови матери по ТУ 9398-001-97638376-2012, производства ООО «ТестГен» (Регистрационное удостоверение №РЗН 2015/2703 от 03 февраля 2016 года)», и аналогичные.

Потенциальные потребители медицинского изделия

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях. Профессиональный уровень потенциальных пользователей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

2. Принцип метода

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения процедуры выделения свободно циркулирующей ДНК служит плазма периферической венозной крови человека.

Принцип метода

Принцип используемого в наборе метода основан на обратимом связывании ДНК на поверхности магнитных частиц. После лизирования образца содержащиеся в нём нуклеиновые кислоты связываются с магнитными частицами. Затем они должны быть отмыты растворами для промывки № 1 и №2, входящими в состав набора. После нескольких циклов отмытки осадок магнитных частиц должен быть высушен, после чего можно элюировать нуклеиновые кислоты.

Общее время проведения процедуры выделения ДНК из 1 образца составляет 70 минут.

3. Состав набора реагентов

Варианты исполнения

Набор реагентов «ДНК-Плазма-М-RT» выпускается в трех вариантах исполнения:

- 1) «ДНК-Плазма-М-RT-25» на 25 выделений,
- 2) «ДНК-Плазма-М-RT-50» на 50 выделений,
- 3) «ДНК-Плазма-М-RT-50» на 50 выделений с магнитным штативом.

Набор реагентов «ДНК-Плазма-М-RT» рассчитан для выделения из 2 мл плазмы.

Состав набора

Таблица 1 – Состав набора реагентов «ДНК-Плазма-М-RT»

№ пп	Название реагента	Описание	Исполнение		
			«ДНК-Плазма-М-RT-25» на 25 выделений	«ДНК-Плазма-М-RT-50» на 50 выделений	«ДНК-Плазма-М-RT-50» на 50 выделений с магнитным штативом»
1	Буфер для связывания ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон (90 мл)	2 флакона (по 90 мл)	2 флакона (по 90 мл)

№ пп	Название реагента	Описание	Исполнение		
			«ДНК-Плазма-М-RT-25» на 25 выделений	«ДНК-Плазма-М-RT-50» на 50 выделений	«ДНК-Плазма-М-RT-50» на 50 выделений с магнитным штативом»
2	Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон (20 мл)	1 флакон (40 мл)	1 флакон (40 мл)
3	Магнитные частицы, МЧ	Коричневая жидкость	1 пробирка (600 мкл)	1 пробирка (1200 мкл)	1 пробирка (1200 мкл)
4	Раствор для промывки №1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон (16 мл)	1 флакон (30 мл)	1 флакон (30 мл)
5	Раствор для промывки №2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон (8 мл)	1 флакон (15 мл)	1 флакон (15 мл)
6	Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон (3 мл)	1 флакон (6 мл)	1 флакон (6 мл)
7	Магнитный штатив	Держатель пробирок объемом 1,5 мл и 15 мл с магнитом 100*15*15 мм	-	-	1 шт.

В наборе для выделения не используются калибраторы и контрольные материалы.

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

Примечание: изделие не содержит другие ингредиенты, которые могут оказать влияние на проведение процедуры.

4. Характеристики набора реагентов

4.1 Технические и функциональные характеристики

Таблица 2 – Технические и функциональные характеристики набора реагентов «ДНК-Плазма-М-RT»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1.1. Внешний вид	
1.1.1 Набор реагентов «ДНК-Плазма-М-RT-25» на 25 выделений	
Буфер для связывания ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость
Магнитные частицы, МЧ	Коричневая жидкость
Раствор для промывки №1	Прозрачная бесцветная жидкость
Раствор для промывки №2	Прозрачная бесцветная жидкость
Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость
1.1.2 Набор реагентов «ДНК-Плазма-М-RT-50» на 50 выделений	
Буфер для связывания ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость
Магнитные частицы, МЧ	Коричневая жидкость
Раствор для промывки №1	Прозрачная бесцветная жидкость
Раствор для промывки №2	Прозрачная бесцветная жидкость
Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость
1.1.3 Набор реагентов «ДНК-Плазма-М-RT-50» на 50 выделений с магнитным штативом	
Буфер для связывания ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость

Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость
Магнитные частицы, МЧ	Коричневая жидкость
Раствор для промывки №1	Прозрачная бесцветная жидкость
Раствор для промывки №2	Прозрачная бесцветная жидкость
Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость
Магнитный штатив	Держатель пробирок объемом 1,5 мл и 15 мл с магнитом 100*15*15 мм
1.2 Физико-химические показатели	
Показатели концентрации ионов водорода, рН	
Буфер для связывания ДНК	min 6,0 рН, max 8,0 рН
Раствор для промывки №1	min 6,0 рН, max 8,0 рН
Раствор для промывки №2	min 6,0 рН, max 8,0 рН
1.3. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-010-97638376-2017
1.4. Маркировка	В соответствии с п. 1.5 ТУ 21.20.23-010-97638376-2017
1.5. Упаковка	В соответствии с п. 1.6 ТУ 21.20.23-010-97638376-2017
2. Функциональные характеристики	
2.1. Эффективность выделения ДНК, %, не менее	20
2.2. Чистота выделения ДНК, А260/280, не менее	1,6

4.3 Характеристики клинической эффективности:

Так как цель клинических испытаний заключалась в проверке функциональных свойств и (или) эффективности медицинского изделия при использовании его в соответствии с назначением,

предусмотренным документацией производителя, то по результатам проведенных клинических испытаний, в серии из 150 опытов с образцами выделенной свободно циркулирующей ДНК, на уровне 98,1 % с доверительной вероятностью 90% подтверждены показатели функциональных свойств исследуемого медицинского изделия (эффективность выделения ДНК - не менее 20%, чистота выделения ДНК, A260/280 - не менее 1,6) и эффективности при использовании его в соответствии с назначением (ДНК, выделенная из образцов плазмы крови пригодна для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом).

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «ДНК-Плазма-M-RT»

В пограничную зону риска вошли опасности:

- потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях,

- наличие загрязняющих примесей в ДНК;

- проведение процедуры выделения ДНК из недостаточного количества плазмы крови;

- невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации, вследствие работы с набором неквалифицированного персонала.

- использование непригодного для применения набора (использование по истечению срока годности или при нарушении упаковки);

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для выделения свободно циркулирующей ДНК из плазмы крови (ДНК-Плазма-M-RT)» производства ООО «ТестГен» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2а в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских

изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» 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 СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»;

- убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»;

- лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса;

- неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»;

- использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром.

Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов;

- поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин;

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе с набором только специально обученный персонал;

- не использовать набор по истечению срока годности;

- не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию;

- использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно мыть руки по окончанию работы;

- все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. При попадании на кожу или слизистые оболочки компонентов набора место контакта необходимо промыть большим количеством воды.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

Оборудование:

1. Стерильный ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия),
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия),
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия),
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия),
5. Отдельный набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Eppendorf», Германия),
6. Холодильник от +2°С до +8°С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

1. Этиловый спирт (95%),
2. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл, свободные от посторонней ДНК и ДНКаз (например, «Ахуген», США),
3. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 15 мл, свободные от посторонней ДНК и ДНКаз (например, «Ахуген», США),
4. Штативы для пробирок объемом 15 мл и 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США),
5. Магнитный штатив для пробирок объемом 1,5 и 15 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия),
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером 100 мкл, 1000 мкл и 5 мл, свободные от посторонней ДНК и ДНКаз (например, «Ахуген», США),
7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема 100 мкл и 1000 мкл, свободные от посторонней ДНК и ДНКаз (например, «Ахуген», США),
8. Одноразовые или отдельные халаты и одноразовые перчатки,
9. Емкости с дезинфицирующим раствором.

Измерительное оборудование при эксплуатации набора не требуется.

8. Анализируемые пробы

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012г.

Материалом для проведения процедуры выделения свободно циркулирующей ДНК служит плазма периферической венозной крови человека.

8.1 Процедура получения биологического материала.

Отбор проб.

Для получения плазмы периферическую венозную кровь отбирают в пробирку с добавленной в качестве антикоагулянта CPDA или EDTA-K2. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2–3 раза.

Условия транспортирования и хранения исходного клинического материала:

При использовании пробирок с CPDA в качестве антикоагулянта допускается транспортировка цельной крови в лабораторию в течение 2 суток при температуре 4-8 °С. С момента взятия крови и получения плазмы, должно пройти не более 48 часов.

При использовании пробирок с EDTA-K2 в качестве антикоагулянта, кровь необходимо доставить в лабораторию в течение 1 часа. С момента взятия крови и получения плазмы должно пройти не более 2-3 часов.

ВНИМАНИЕ! Важно исключить замораживание и прогрев пробирки с кровью выше 25 °С.

Пробоподготовка.

Пробирку с кровью центрифугировать 10-15 мин при 2000-3000g, после чего аккуратно отобрать верхний слой плазмы и перенести его в отдельную одноразовую пробирку, избегая попадания в отбираемый материал сгустков лейкоцитов и слоев с эритроцитами. Плазму центрифугировать 15 минут при 13000g или 10 минут при 16000g, вновь отобрать верхний слой в отдельную

пробирку, не затрагивая осадка на дне пробирки. Полученную плазму можно использовать для выделения.

8.2 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «ДНК-Плазма-М-RT» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые будут встречаться при процедуре взятия цельной периферической крови человека и при нормальном использовании набора реагентов «ДНК-Плазма-М-RT», и предположительно влиять на результат выделения свободно циркулирующей ДНК из плазмы крови человека соответствующего качества и количества, необходимого для проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени.

Потенциально интерферирующие вещества, которые могут встречаться при проведении процедуры взятия цельной периферической крови человека, попасть в анализируемые образцы ДНК и оказать влияние на способность набора реагентов «ДНК-Плазма-М-RT» выделять свободно циркулирующую ДНК из плазмы крови человека, и диапазон исследуемых концентраций приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Потенциально интерферирующие вещества на этапе взятия цельной периферической крови, превышение которых вызывает ингибирование ПЦР.

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация	Минимальная концентрация
Гепарин (антикоагулянт)	0,15 ед/мл	0,075 ед/мл
Цитрат натрия (антикоагулянт)	1 ммоль/л	0,5 ммоль/л
Гемоглобин - высокомолекулярная фракция белка (гемолиз)	1 мг/мл	0,5 мг/мл
Триглицериды (хилез)	0,5 ммоль/л	0,25 ммоль/л

Для исследования потенциально интерферирующих веществ при нормальном использовании набора реагентов «ДНК-Плазма-М-

RT» в качестве интерферирующего вещества выбран этиловый спирт (95%), который добавляют в «Раствор для промывки №1» и «Раствор для промывки №2» на этапе подготовки компонентов набора для исследования, из-за его потенциального ингибирующего воздействие на ПЦР. Концентрации потенциально интерферирующего вещества приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Диапазон концентраций интерферирующих веществ, проверенных при проведении исследования

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация (мкл / 200 мкл раствора ДНК)	Минимальная концентрация (мкл / 200 мкл раствора ДНК)
Этиловый спирт (95%)	$1,35 \cdot 10^{-3}$	$3,38 \cdot 10^{-4}$

Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ было выполнено исследование путем анализа их воздействия в двух концентрациях (максимальной и минимальной), диапазон которых, как ожидается, будет встречаться при процедуре взятия цельной периферической крови человека и при нормальном использовании набора реагентов «ДНК-Плазма-M-RT», на значения чистоты выделения ДНК (выраженную в отношении оптических плотностей раствора выделенной ДНК, A260/280) и эффективности выделения ДНК (выраженной в %) с последующим проведением анализа методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени.

На основании полученных результатов, вещества, попадающие в образцы ДНК, способны оказать интерферирующее воздействие при концентрациях, превышающих допустимые:

Интерферирующие вещества	Концентрации, ингибирующие ПЦР
Гепарин (антикоагулянт)	$\geq 0,15$ ед/мл
Цитрат натрия (антикоагулянт)	>1 ммоль/л

Гемоглобин-высокомолекулярная фракция белка (гемолиз)	≥ 1 мг/мл
Триглицериды (хилез)	$>0,5$ ммоль/л

По результатам исследования этиловый спирт, оцениваемый при концентрациях, которые могут встречаться при нормальном использовании набора реагентов, не влияет на способность набора реагентов «ДНК-Плазма-М-RT» выделять свободно циркулирующую ДНК (сцДНК) из плазмы крови соответствующего качества и количества, необходимого для проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени.

8.3 Ограничения по использованию анализируемого материала:

- Для получения плазмы кровь отбирают в пробирку с добавленной в качестве антикоагулянта CPDA или EDTA-K2. При использовании пробирок с CPDA в качестве антикоагулянта допускается транспортировка цельной крови в лабораторию в течение 2 суток при температуре 4-8 °С. При использовании EDTA-K2 следует отделить плазму в течение 2-3 часов с момента взятия крови.

- Не допускается замораживание крови до процедуры получения плазмы.

- Не допускается работа с гемолизированной и хилезной кровью, при постановке анализа таких образцов могут получиться недостоверные результаты.

- При получении плазмы не допускается её контаминация клетками крови.

- Допускается только однократное замораживание-оттаивание полученной плазмы.

- После окончания процедуры выделения ДНК следует сразу приступить к проведению ПЦР-реакции.

- Ошибки оператора при взятии крови, получении плазмы и в ходе процедуры выделения ДНК, нарушение рекомендованной инструкции может привести к получению недостоверных результатов.

8.4 Условия возможного хранения анализируемых образцов

Условия транспортирования и хранения исходного клинического материала:

При использовании пробирок с CPDA в качестве антикоагулянта допускается транспортировка цельной крови в лабораторию в течение 2 суток при температуре 4-8 °С. С момента взятия крови и получения плазмы, должно пройти не более 48 часов.

При использовании пробирок с EDTA-K2 в качестве антикоагулянта, кровь необходимо доставить в лабораторию в течение 1 часа. С момента взятия крови и получения плазмы должно пройти не более 2-3 часов.

ВНИМАНИЕ! Важно исключить замораживание и прогрев пробирки с кровью выше 25 °С.

Условия хранения плазмы:

- при температуре не выше 4–8 °С — не более 5 суток;
- при температуре не выше минус 20°С — в течение месяца;
- при температуре минус 70 °С — длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

ВНИМАНИЕ! Не брать в работу гемолизированную и хилезную кровь. При постановке анализа таких образцов могут получиться недостоверные результаты!

Условия хранения пробы свободно циркулирующей ДНК (сцДНК), выделенной из плазмы крови:

Полученная ДНК должна храниться при температуре от +2 до +8°С не более 12 часов до проведения анализа, при температуре минус 20 °С – не более 3 месяцев или при температуре минус 70 °С – не более 1 года.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

Если образец плазмы хранился в холодильнике, перед процедурой выделения плазму прогреть до комнатной температуры.

!!!Суспензия магнитных частиц является двухфазной, легко и быстро образует четко разделяемые две фазы. Перед началом работы и перед каждой манипуляцией с раствором магнитных частиц полностью ресуспендировать раствор магнитных частиц на вортексе или пипетированием.

Расслоение или выпадение кристаллического осадка не влияет на качество растворов. Если образовался кристаллический осадок или расслоение компонентов, необходимо прогреть флаконы при 50 °С и тщательно перемешать до полного растворения осадка и гомогенизации растворов.

Все компоненты набора перед началом работы необходимо тщательно перемешать.

Перед началом работы необходимо приготовить **«Раствор для промывки №1»** и **«Раствор для промывки №2»**.

Для **«ДНК-Плазма-М-RT-25»**:

1) добавить 8 мл этилового спирта (95%) к «Раствору для промывки №1».

2) добавить 32 мл этилового спирта (95%) к «Раствору для промывки №2».

Нанести пометку на этикетке флакона о выполнении операции.

Для **«ДНК-Плазма-М-RT-50»** и **«ДНК-Плазма-М-RT-50» с магнитным штативом**:

1) добавить 15 мл этилового спирта (95%) к «Раствору для промывки №1».

2) добавить по 60 мл этилового спирта (95%) в каждый флакон к «Растворам для промывки №2».

Нанести пометку на этикетке флакона о выполнении операции.

10. Проведение исследования

К работе с набором допускается только специально обученный персонал с навыками проведения ПЦР-анализов.

Протокол выделения можно модифицировать для масштабирования в случае, когда требуется получение большего количества конечного материала:

Объем плазмы	Объем лизирующего раствора, мкл	Объем буфера для	Объем МЧ, мкл	Объем раствора для	Объем раствора для
--------------	---------------------------------	------------------	---------------	--------------------	--------------------

		связывания ДНК, мкл		промывки №1, мкл	промывки №2, мкл
2 мл	600	3 000	20	700	700
3 мл	900	4 500			
4 мл	1 200	6 000			
5 мл	1 500	7 500			

Выделение ДНК проводится из 2 мл образца плазмы.

Для каждого образца подготовить 2 пробирки на 15 мл и 2 пробирки на 1,5 или 2 мл.

Подписать пробирки соответственно образцам.

1. В 15 мл пробирку внести 2 мл плазмы и добавить 600 мкл лизирующего раствора. Перемешать на вортексе.

2. Инкубировать при комнатной температуре 5 минут, периодически перемешивая раствор.

3. В отдельной 15 мл пробирке смешать 3 мл связывающего буфера и 20 мкл магнитных частиц. Перемешать на вортексе.

4. Внести суспензию магнитных частиц в связывающем буфере в пробирку с плазмой (п. 1), перемешать на вортексе.

5. Инкубировать при комнатной температуре 15 минут, периодически перемешивая раствор на вортексе.

6. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки (обычно требуется 5-10 минут), и удалить супернатант.

7. Внести в пробирку 700 мкл раствора для промывки №1. Полностью ресуспендировать магнитные частицы в растворе пипетированием и перенести получившуюся суспензию магнитных частиц в растворе для промывки №1 в 1,5 мл пробирку.

8. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки, и удалить супернатант (обычно требуется 1 минута).

9. Внести в пробирку 700 мкл раствора для промывки №2, тщательно перемешать на вортексе. Сбросить капли кратковременным центрифугированием.

10. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки, и полностью удалить супернатант (обычно требуется 1 минута).

11. Повторить пункты «9» и «10».

12. Поместить пробирку с приоткрытой крышкой в термостат и инкубировать при 60 °С 10 минут для просушки и удаления остаточного этанола.

Необходимо удостовериться в полном удалении остаточного этанола!

13. Внести в пробирку 60 мкл элюента. Тщательно ресуспендировать частицы пипетированием.

14. Инкубировать в термостате при 60 °С 10 минут.

15. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки, перенести супернатант, содержащий выделенную ДНК, в новую пробирку.

При постановке ПЦР пробирку с выделенной ДНК рекомендуется держать на магнитном штативе.

При необходимости объем элюента можно увеличить, но при этом снизится концентрация ДНК. Увеличить концентрацию ДНК можно путем снижения объема элюента.

ВНИМАНИЕ! В случае, если целью выделения является анализ фетальной ДНК, присутствующей в крови матери, следует сразу после окончания процедуры выделения приступить к проведению ПЦР-реакции. Фетальная ДНК присутствует в крови матери в очень низких концентрациях и в деградированном состоянии, в процессе хранения фетальная ДНК может разрушиться, что может привести к ложноотрицательным результатам.

11. Возможные проблемы и их решение

1. Низкий выход ДНК, причина и возможное решение:

- состояние образца (в образце содержится недостаточное количество ДНК; образец долго хранился или неправильно хранился или несколько раз подвергался процедуре замораживания-оттаивания) – возможные решения: брать больше исходного материала или проводить элюцию в меньшее количество буфера; повторить сбор материала;

- магнитные частицы плохо собираются на магните, что делает невозможным удаление супернатанта после инкубации (п.6), супернатант мутный – прогреть пробирку при температуре 60⁰С до полного просветления раствора. Плазму, хранившуюся в

холодильнике, перед проведением процедуры выделения прогреть до комнатной температуры.

- неполное высушивание частиц перед добавлением элюента – полностью удалить раствор для промывки №2, увеличить время сушки после удаления раствора для промывки №2;

- пересушивание магнитных частиц – просушивать магнитные частицы в течении 10 минут;

- неполный лизис – после внесения лизирующего раствора как можно тщательнее суспендировать образец;

- большой объем элюента – подберите оптимальный объем элюента для получения нужной концентрации ДНК.

2. Примеси белка – нужно добиваться максимально тщательного суспендирования магнитных частиц.

3. Возможная деградация ДНК, причина и возможное решение – старый образец, либо образец подвергался замораживанию-оттаиванию – необходимо провести сбор материала повторно. Избегать замораживания образца в процессе транспортировки и хранения.

Если у Вас есть вопросы или Вы нуждаетесь в консультации, обратитесь в службу поддержки компании «ТестГен» - см. раздел 14.

12. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации набора

Хранение.

Набор реагентов «ДНК-Плазма-М-RT» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре не выше +30 °С и относительной влажности воздуха до 90%. Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Транспортирование. Транспортировать набор реагентов «ДНК-Плазма-М-RT» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Набор реагентов транспортировать при температуре не выше +30 °С и относительной влажности воздуха до 90%. Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

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

Срок годности. Срок годности набора «ДНК-Плазма-М-RT» 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре не выше +30 °С.

После вскрытия флаконов и добавления этилового спирта (95%) к «Раствору для промывки №1» и «Раствору для промывки №2» срок годности 6 мес.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 4.28 СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания

по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «ДНК-Плазма-М-RT» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «ДНК-Плазма-М-RT» требованиям технических условий при соблюдении установленных требований к транспортированию, хранению и эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен»
(ООО «ТестГен»),

432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

Е-mail: help@testgen.ru

Инструкция по применению соответствует требованиям Приказа Минздрава России от 09.01.2014 №2н, Приказа Минздрава России от 19.01.2017 № 11н, ГОСТ 51088-2013.

Приложение А

Перечень применяемых национальных стандартов

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 ЕН 13612-2010 «Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики *in vitro*»;

ГОСТ Р 56894-2016 «Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики *in vitro*»;

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 ISO 13485-2017 «Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования».

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.