



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«27» ноября 2020 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для выделения геномной ДНК
человека из фиксированных в формалине и
заклученных в парафин тканей «ДНК-Ткань-М»
по ТУ 21.20.23-012-97638376-2019**

Содержание

Введение	3
1. Назначение	4
2. Принцип метода	6
3. Состав набора реагентов	7
4. Характеристики набора реагентов	8
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «ДНК-Ткань-М»	12
6. Меры предосторожности при работе с набором	12
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором	17
8. Анализируемые пробы	18
9. Подготовка компонентов набора для исследования	21
10. Проведение исследования	23
11. Возможные проблемы и их решение	27
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора	28
13. Утилизация	29
14. Гарантийные обязательства, контакты	31

Введение

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

Научная обоснованность.

Фиксация ткани в формалине, проводка согласно тому или иному протоколу и заливка в парафин для последующего изготовления препаратов – общепринятый способ подготовки образцов к гистологическому исследованию. Этот подход позволяет сохранить структуру тканей и хранить материал в течение длительного времени. Архивы, в которых хранятся образцы ткани в виде парафиновых блоков, служат незаменимым источником материала для масштабных ретроспективных исследований, включая исследования с использованием методик, недоступных на момент помещения блока в архив. Сегодня, когда появляется всё больше сведений о молекулярных основах патогенеза различных заболеваний, изучение ДНК и РНК, содержащихся в гистологическом материале, необходимо для научных исследований и становится частью рутинной диагностической практики.¹

Существуют различные способы депарафинизации, наиболее распространённый из которых – промывка в ксилоле, которую проводят обычно в нагретом растворе. Некоторые дополнительные меры могут быть приняты для повышения качества препарата ДНК или РНК непосредственно перед началом процедуры выделения. Это термическая обработка и ферментативная обработка материала с использованием протеиназы К. Использование повышенных температур при инкубировании образца обосновано тем, что в таких условиях происходит восстановление обратимых повреждений нуклеиновых кислот, вызванных воздействием формалина.

Нуклеиновые кислоты, выделенные с соблюдением требуемых условий из ткани, залитой в парафиновый блок, могут быть

¹ Ваганова А.Н. Гистотехнические решения для повышения качества препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из парафиновых блоков / А.Н. Ваганова // Гены и клетки. - 2014. - Т. 9, №2. - С.96-101.

использованы для ПЦР и ОТ-ПЦР, секвенирования, исследования на микрочипах и других молекулярно-биологических методик.¹

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: Набор реагентов «ДНК-Ткань-М» рекомендуется использовать для обеспечения преаналитической стадии проведения анализов в клинической лабораторной диагностике. Выделенная геномная ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) пригодна для проведения исследований методом ПЦР.

Противопоказания: при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению противопоказания не выявлены.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «ДНК-Ткань-М» предназначен для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) методом, основанном на лизисе образца, связывании нуклеиновых кислот на поверхности магнитных частиц, несколькими раундами промывки и элюирования для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом ПЦР.

Функциональное назначение: Набор реагентов «ДНК-Ткань-М» предназначен для обеспечения преаналитической стадии молекулярно-генетического анализа. Выделенная из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) геномная ДНК человека может использоваться для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике, в частности в онкологии, при исследовании методом ПЦР.

Например, при последующем проведении анализов выделенной геномной ДНК могут совместно применяться следующие медицинские изделия:

- Набор реагентов для определения статуса мутаций гена EGFR методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из

образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-EGFR-ткань) по ТУ 21.20.23-005-97638376-2016, производства ООО «ТестГен» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7670 от 04.10.2018);

- Набор реагентов для определения статуса мутаций гена NRAS методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-NRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-008-97638376-2016, производства ООО «ТестГен» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7771 от 02.11.2018);

- Набор реагентов для определения статуса мутаций гена KRAS методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016, производства ООО «ТестГен» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7776 от 02.11.2018);

- Набор реагентов для определения статуса мутаций гена BRAF методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-BRAF-ткань) по ТУ 21.20.23-007-97638376-2017, производства ООО «ТестГен» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2019/9187 от 07.11.2019).

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 нуклеиновых кислот служит фиксированная в формалине и заключенная в парафин ткань (FFPE-блоки).

Принцип метода

Принцип метода основан на депарафинизации FFPE-блоков (путем инкубации их с ксилолом или минеральным маслом) и протеиназной обработке и последующей дегидратации с применением этилового спирта (95%).

После лизиса 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, затем нуклеиновые кислоты можно элюировать.

Функциональные возможности набора позволяют использовать его для процесса выделения ДНК на автоматических станциях.

Ограничения метода

Возможна контаминация биологического материала на этапе пробоподготовки либо выделения ДНК. Контаминация может быть выявлена с помощью отрицательного контрольного образца, обязательно сопровождающего запуск ПЦР.

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

Использование набора с истекшим сроком годности или условий хранения набора.

Нарушение условий хранения и транспортирования образцов.

Общее время проведения процедуры выделения ДНК из 1 образца – от 3 часов.

3. Состав набора реагентов

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

- 1) «ДНК-Ткань-М-50» на 50 выделений,
- 2) «ДНК-Ткань-М-100» на 100 выделений,
- 3) «ДНК-Ткань-М-100» на 100 выделений с магнитным

штативом.

Состав набора

Таблица 1 – Состав набора реагентов «ДНК-Ткань-М»

№ пп	Название реагента	Описание	Исполнение		
			«ДНК-Ткань-М-50» на 50 выделений	«ДНК-Ткань-М-100» на 100 выделений	«ДНК-Ткань-М-100» на 100 выделений с магнитным штативом
1	Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон, (10 мл)	1 флакон, (20 мл)	1 флакон, (20 мл)
2	Буфер для связывания ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон, (15 мл)	1 флакон, (30 мл)	1 флакон, (30 мл)
3	Раствор для промывки №1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон, (25 мл)	1 флакон, (50 мл)	1 флакон, (50 мл)
4	Раствор для промывки №2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон, (15 мл)	2 флакона, (по 15 мл)	2 флакона, (по 15 мл)
5	Раствор для разведения протеиназы К	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон, (2,5 мл)	1 флакон, (5 мл)	1 флакон, (5 мл)
6	Протеиназа К	Белый порошок	1 флакон, (50 мг)	1 флакон, (100 мг)	1 флакон, (100 мг)
7	Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон, (5 мл)	1 флакон, (10 мл)	1 флакон, (10 мл)
8	Магнитные частицы, МЧ	Коричневая жидкость	1 пробирка, (600 мкл)	1 пробирка, (1200 мкл)	1 пробирка, (1200 мкл)
9	Магнитный штатив	Держатель пробирок объемом 1,5-2,0 мл с магнитом	-	-	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.

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-Ткань-М»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1.1. Внешний вид	
1.1.1 Набор реагентов «ДНК-Ткань-М-50» на 50 выделений	
Буфер для связывания ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость
Раствор для разведения протеиназы К	Прозрачная бесцветная жидкость
Протеиназа К	Белый порошок
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-Ткань-М-100» на 100 выделений	
Буфер для связывания ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость
Раствор для разведения протеиназы К	Прозрачная бесцветная жидкость
Протеиназа К	Белый порошок
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-Ткань-М-100» на 100 выделений с магнитным штативом	
Буфер для связывания ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость

Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость
Раствор для разведения протеиназы К	Прозрачная бесцветная жидкость
Протеиназа К	Белый порошок
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 1,5-2,0 мл с магнитом
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 21.20.23-012-97638376-2019
1.4. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-012-97638376-2019
1.5. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-012-97638376-2019
2. Функциональные характеристики	
2.1 Чистота выделения ДНК, A260/280, не менее	1,7
2.2. Концентрация выделенной ДНК из 30 мг фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани, нг/мкл, не менее	5
2.3. Отсутствие контаминации компонентов набора посторонней ДНК	Отрицательный результат с ОКО в контрольной ПЦР

Примечание: при проведении контрольной ПЦР в качестве отрицательного контрольного образца (ОКО) используют деионизованную стерильную воду, свободную от ДНКаз/РНКаза.

Для оценки функциональных характеристик набора реагентов «ДНК-Ткань-М» было выполнено исследование путем проведения процедур выделения ДНК в соответствии с инструкцией к набору из фиксированных в формалине и заключенных в парафин различных типов тканей человека: печень, почка, селезенка, кишечник, мозг, мышцы, легкие.

Количество фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани составляло 30 мг. В каждом срезе с FFPE-блока площадь фрагмента фиксированной ткани составляла до 250 мм², толщина среза – до 10 мкм.

После процедуры выделения геномной ДНК проводили оценку чистоты выделения ДНК (выраженную в отношении оптических плотностей раствора выделенной ДНК, A_{260/280}) и концентрацию выделенной ДНК (выраженной в нг/мкл).

Результаты исследования представлены в таблице 3.

На основании полученных результатов процедуры выделения ДНК набором реагентов «ДНК-Ткань-М» из фиксированных в формалине и заключенных в парафин различных типов тканей человека (печень, почка, селезенка, кишечник, мозг, мышцы, легкие) можно заключить:

1. Концентрация выделенной ДНК из 30 мг фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани составляет не менее 5 нг/мкл, что является достаточным для проведения дальнейшей ПЦР-реакции.

2. Чистота выделения ДНК, определенная как отношение поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм (260нм/280нм) составляет не менее 1,7, что является приемлемым для проведения дальнейшей ПЦР-реакции.

Таблица 3 – Результаты исследования функциональных характеристик «ДНК-Ткань-М».

Тип ткани	Количество фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани, мг	Концентрация выделенной ДНК, нг/мкл	Чистота выделения ДНК, A260/280
печень	30	15,9	1,7
почка	30	15,6	1,8
селезенка	30	18,0	1,8
кишечник	30	16,6	1,7
мозг	30	17,7	1,7
мышцы	30	6,2	1,7
легкие	30	17,9	1,8

4.2 Характеристики клинической эффективности

По результатам проведенных клинических испытаний подтверждена эффективность медицинского изделия при использовании его в соответствии с назначением путем проведения клинико-лабораторных испытаний методом ПЦР с образцами выделенной геномной ДНК из 110 образцов фиксированных в формалине и заключенных в парафин различных типов тканей человека (кишечник, легкие, кожа) с использованием зарегистрированных медицинских изделий для диагностики *in vitro*.

Для оценки межсерийной сходимости процедура выделения ДНК из образцов фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани (FFPE-блоки) была проведена в двух сериях. Таким образом, проверка качества, безопасности и эффективности медицинского изделия была проверена в 220 опытах.

100 %-ный результат исследования эффективности медицинского изделия при использовании его в соответствии с назначением в серии из 220 опытов подтвердил клиническую эффективность применения медицинского изделия и с доверительной вероятностью 95% она составляет 100% (95% ДИ:96%-100%).

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «ДНК-Ткань-М»

В пограничную зону риска вошли опасности:

- потеря функциональных свойств реагентов, входящих в состав набора, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях,
- использование среза с FFPE-блока в количестве, недостаточном для проведения процедуры выделения ДНК;
- кросс-контаминация образцов при подготовке срезов с парафиновых блоков;
- невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации, вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;
- 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 геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей «ДНК-Ткань-М» по ТУ 21.20.23-012-97638376-2019», 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 с клиническим материалом при использовании набора реагентов «ДНК-Ткань-М» должна осуществляться согласно методическим рекомендациям «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012 г.

Опасные компоненты набора в соответствии с «согласованной на глобальном уровне системой классификации опасности и маркировки химической продукции (СГС)» приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Опасные компоненты набора

Наименование реагента	Опасный компонент в составе	Пиктограмма опасности СГС	Фразы опасности	Предупредительные фразы
Буфер для связывания ДНК	Гуанидин-тиоцианат CAS 593-84-0		302, 315, 319	264, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338, 330, 332+313, 337+313
Раствор для промывки №1	Гуанидин-тиоцианат CAS 593-84-0		302, 315, 319	264, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338, 330, 332+313, 337+313
Протеиназа К	Протеиназа К CAS 39450-01-6	 	332, 334	261, 272, 280, 302+352, 304+340, 333+313, 342+311, 363

Фразы опасности

Н 302	Вредно при проглатывании
Н 315	Вызывает раздражение кожи
Н 319	Вызывает серьёзное раздражение глаз
Н 332	Наносит вред при вдыхании
Н 334	При вдыхании может вызывать аллергические или астматические симптомы или затруднение дыхания

Предупредительные фразы

P 261	Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/тумана/паров/вещества в распылённом состоянии.
P 264	После работы тщательно вымыть ...
P 272	Не выносить загрязнённую одежду с места работы.
P 280	Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/средствами защиты глаз/лица.

- Р 301+312 При проглатывании: Обратиться в токсикологический центр/или к специалисту/.../ при плохом самочувствии.
- Р 302+352 При попадании на кожу: Промыть большим количеством воды/...
- Р 304+340 При вдыхании: Вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить ему полный покой в удобном для дыхания положении.
- Р 305+351+338 При попадании в глаза: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими, и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.
- Р 330 Прополоскать рот.
- Р 332+313 При раздражении кожи: обратиться к врачу.
- Р 333+313 При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.
- Р 337+313 Если раздражение глаз не проходит: обратиться к врачу.
- Р 342+311 При появлении респираторных симптомов: обратиться в токсикологический центр или к врачу-специалисту/...
- Р 363 Постирать загрязнённую одежду перед последующим использованием.



Символ, изображённый на этикетке, указывает на наличие дополнительной информации о безопасности в соответствующем разделе Инструкции.



Символ опасности при аспирации

При применении реагентов, входящих в набор «ДНК-Ткань-М», не происходит загрязнение окружающей среды.

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 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и 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 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий

городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

- 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 минут;

- 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.

ВНИМАНИЕ! Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки аспираторов на 20-24 часа в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий раствор.

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. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. g (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия),
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,
7. Морозильная камера от -2 °С до -40 °С,

Дополнительно могут быть использованы:

8. Аспиратор с колбой-ловушкой (например, «FTA-1», Biosan, Латвия).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

1. Ксилол или минеральное масло легкое белое (парафиновое) (например, производства «Panreac» или аналогичное).
2. Этиловый спирт (95%),
3. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микроцентрифужные пробирки на 1,5-2,0 мл, свободные от посторонней ДНК и ДНКаз (например, «Axugen», США),
4. Штативы для пробирок на 1,5-2,0 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Axugen», США)

5. Магнитный штатив для пробирок объемом 1,5-2,0 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия),

6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 100 мкл и 1000 мкл, свободные от посторонней ДНК и ДНКаз (например, «Ахуген», США),

7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 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.

Использование других материалов и реагентов, не входящих в состав изделия, не предусмотрено.

Измерительное оборудование при эксплуатации набора не требуется.

8. Анализируемые пробы

Материалом для проведения процедуры выделения нуклеиновых кислот служит фиксированная в формалине и заключенная в парафин ткань (FFPE-блоки).

Для получения срезов необходимо использовать микротом. В каждом срезе с FFPE-блока площадь фрагмента фиксированной ткани должна составлять до 250 мм², толщина среза – до 10 мкм.

Для выделения ДНК рекомендуется использовать 2 среза с FFPE-блока.

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

8.1 Процедура получения биологического материала

Требования к подготовке образцов ткани в FFPE-блоках

8.1.1 При фиксации ткани формалином использовать 10 % нейтральный формалин (рН от 7.0 до 7.6).

8.1.2 Проводить фиксацию ткани формалином не дольше 24 часов.

8.1.3 Для декальцинации использовать реагенты только на основе EDTA.

ВНИМАНИЕ! Образцы после декальцинации с применением муравьиной или азотной кислоты для молекулярного исследования не пригодны.

8.1.4 Работать в перчатках, внутри вытяжных или ламинарных шкафов, использовать одноразовые инструменты и расходные материалы.

8.1.5 Избегать соприкосновения фрагментов биологического материала друг с другом и с любым другим биологическим материалом.

8.1.6 Общий срок хранения фиксированных формалином и залитых парафином образцов ткани (FFPE-блоки) не более 3 лет при температуре от +15 до +25 °С.

8.2 Интерферирующие вещества и ограничения метода

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «ДНК-Ткань-М» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые встречаются при процедуре выделения ДНК и при процедуре подготовки образцов ткани в FFPE-блоках.

К ингибиторам ПЦР, которые встречаются при процедуре выделения ДНК из фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани (FFPE-блоков), по результатам анализа рисков и проведения НИОКР отнесены следующие вещества: натрий додецилсульфат (входящий в состав буфера для связывания), этанол (входящий в состав раствора для промывки №1 и раствора для промывки №2), а также ксилол (используемый для депарафинизации FFPE-блоков), которые могут присутствовать в элюате с ДНК в результате неполного удаления в ходе проведения процедуры выделения ДНК.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось влияние на амплификацию лабораторного контрольного образца: натрий додецилсульфат – 0,007мкг/мл образца ДНК, этанол – 5 мкл/мл образца ДНК, ксилол – 0,001 мкл/мл образца ДНК.

К ингибиторам ПЦР, которые встречаются при процедуре подготовки образцов ткани в FFPE-блоках отнесены:

- парафин, который используется для приготовления FFPE-блоков,
- гемоглобин крови, содержащийся в образце ткани,
- элементы тканевого распада и воспаления.

Исследуемые концентрации интерферирующих веществ, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «ДНК-Ткань-М», приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Потенциально интерферирующие вещества, которые могут встречаться при процедуре подготовки образцов ткани в FFPE-блоках и их концентрации

Интерферирующие вещества	Концентрация
Парафин	0,001 мкл/мл образца ДНК
Гемоглобин	0,35 мг/мл образца ДНК
Элементы тканевого распада и воспаления	некроз на уровне > 15 %

На основании результатов исследования, данные вещества, удаляются в ходе выделения геномной ДНК с использованием набора «ДНК-Ткань-М» и не оказывают интерферирующего воздействия.

8.3 Ограничения по использованию анализируемого материала

1. Анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание).

2. Не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

3. При подготовке срезов с парафиновых блоков необходимо минимизировать риск кросс-контаминации образцов, для чего необходимо:

- работать в одноразовых неопудренных перчатках;

- проводить процедуру в ПЦР-боксе или в ламинарном шкафу;
- использовать одноразовые лезвия для микротомы и стерильные пинцеты;
- первые два среза с каждого блока утилизировать, а для молекулярного исследования использовать срезы начиная с третьего;
- не помещать срезы на водяную баню.

8.4 Критерии пригодности гистологических препаратов для выделения ДНК в целях последующего молекулярно-генетического анализа опухолевых клеток

- По результатам морфологического исследования опухолевые комплексы должны занимать не менее 60 % площади ткани в срезе с FFPE-блока.
- По результатам морфологического исследования зоны некроза и кровоизлияния в совокупности должны занимать не более 15 % площади ткани в срезе с FFPE-блока.

В случае, если образец не соответствует хотя бы одному из перечисленных критериев, рекомендуется использовать другой образец.

8.5 Условия возможного хранения анализируемых образцов

Условия хранения фиксированных формалином и залитых парафином образцов ткани (FFPE-блоков):

- при температуре +15 ... +25°C – не более 3 лет.

Условия возможного хранения выделенной ДНК:

- при +4 °C – не более суток,
- при -18 ...-22 °C – не более месяца,
- при -70 °C – длительно.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

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

Выпадение кристаллов не влияет на качество набора. При кристаллизации какого-либо из растворов необходимо прогреть флакон при 50 °C и тщательно перемешать до полного растворения кристаллов и гомогенизации раствора.

Перед началом работы следует приготовить **«Раствор протеиназы К»**. Перенести весь объем «Раствора для разведения протеиназы К» во флакон с сухой «Протеиназой К» и полностью растворить «Протеиназу К».

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

Для «ДНК-Ткань-М-50»:

1) добавить 12,5 мл этилового спирта (95%) к «раствору для промывки №1».

2) добавить 60 мл этилового спирта (95%) к «раствору для промывки №2».

Нанести пометку на этикетке флакона о выполнении операции.

Для «ДНК-Ткань-М-100» и «ДНК-Ткань-М-100» с магнитным штативом:

1) добавить 25 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.

!!! Все компоненты набора перед началом работы необходимо тщательно перемешать.

10. Проведение исследования

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

Образцы для выделения нужно нарезать на срезы непосредственно перед выделением. В каждом срезе с FFPE-блока площадь фрагмента фиксированной ткани должна составлять до 250 мм², толщина среза – до 10 мкм.

Для получения срезов необходимо использовать микротом.

Для выделения ДНК рекомендуется использовать 2 среза с FFPE-блока.

Непосредственно перед процедурой выделения ДНК проводится депарафинизация с помощью ксилола или минерального масла.

Депарафинизация ксилолом:

1. Поместить 2 среза с FFPE-блока (см. раздел 8 «Анализируемые пробы») в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

2. Добавить 1200 мкл ксилола. Закрыть крышку и инкубировать при комнатной температуре до тех пор, пока парафин полностью не растворится (обычно около 2 мин.) и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

3. Центрифугировать в течение 2 мин. при 11 000 g при комнатной температуре (15-25 °C).

4. Удалить супернатант с помощью пипетки или аспиратора, не затрагивая осадок.

5. К осадку добавить 1200 мкл 95% этилового спирта. Перемешать на вортексе (5 сек.). Этиловый спирт экстрагирует остаточный ксилол из образца.

6. Центрифугировать в течение 2 мин. при 11 000 g при комнатной температуре (15-25 °C).

7. Удалить супернатант с помощью пипетки или аспиратора, не затрагивая осадок.

8. Открыть крышку и инкубировать при температуре 60 °C в течение 10 мин. или до тех пор, пока весь остаточный этиловый спирт не испарится. Остаточный этиловый спирт может снизить выход ДНК.

Депарафинизация минеральным маслом:

1. Поместить 2 среза с FFPE-блока (см. раздел 8 «Анализируемые пробы») в пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

2. Добавить 1000 мкл минерального масла, перемешать на вортексе и инкубировать в термостате 10 мин. при 60 °С, периодически перемешивая раствор на вортексе.

3. Центрифугировать в течение 2 мин. при 11 000 g при комнатной температуре (15-25 °С).

4. Удалить масло с помощью пипетки или аспиратора, не затрагивая осадок.

5. К осадку добавить 1000 мкл 95% этилового спирта. Закрыть крышку и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

6. Центрифугировать в течение 2 мин. при 11 000 g при комнатной температуре (15-25 °С). Удалить спирт с помощью пипетки или аспиратора, не затрагивая осадок.

7. Повторить пункты 4 и 5.

8. Инкубировать пробирку в термостате с открытой крышкой при температуре 60 °С в течение 10 мин. или до тех пор, пока весь остаточный этиловый спирт не испарится.

Процедура выделения ДНК из образца ткани после депарафинизации:

1. Ресуспендировать осадок, полученный после депарафинизации, в 180 мкл «Лизирующего раствора», затем добавить 25 мкл раствора «Протеиназы К». Перемешать на вортексе (5 сек.) без образования пены. Ткань должна быть полностью погружена в лизирующий раствор.

2. Инкубировать полученную смесь при 60 °С в течение 1-3 часов до лизиса образца ткани. За время инкубации перемешивать раствор на вортексе в течении 5 сек. каждый час или использовать термомиксер.

3. Перемешать на вортексе (5 сек.) и инкубировать еще 1 час при 90 °С. Эта стадия необходима для удаления химической модификации, вызванной формалином, из ДНК, которая высвобождается в растворе на предыдущем этапе лизиса.

Более длительное время инкубации или более высокие температуры инкубации могут приводить к большей фрагментации ДНК.

4. Подготовить в новой пробирке суспензию магнитных частиц (смешать 250 мкл буфера для связывания ДНК и 10 мкл предварительно тщательно перемешанного раствора магнитных частиц).

5. Охладить пробирку с лизированным образцом ткани до комнатной температуры, сбросить капли коротким центрифугированием, аккуратно перемешать раствор пипетированием и перенести его в пробирку с подготовленным раствором магнитных частиц. Перемешать на вортексе 3-5 сек.

6. Инкубировать пробирку при комнатной температуре в течение 5 мин., перемешивая раствор во время инкубации 2-3 раза на вортексе (1-2 сек.) или переворачивая пробирку 2-3 раза.

7. Сбросить капли коротким центрифугированием и поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки (обычно требуется около 2 мин.) и удалить супернатант.

8. Внести в пробирку 700 мкл хорошо перемешанного раствора для промывки №1, тщательно ресуспендировать магнитные частицы в растворе пипетированием или на вортексе.

9. Сбросить капли коротким центрифугированием и поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки (обычно требуется 1-2 мин.) и удалить супернатант.

10. Внести в пробирку 700 мкл хорошо перемешанного раствора для промывки №2, тщательно перемешать пипетированием или на вортексе.

11. Сбросить капли коротким центрифугированием и поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и удалить супернатант.

12. Внести в пробирку 700 мкл хорошо перемешанного раствора для промывки №2, тщательно перемешать пипетированием или на вортексе.

13. Сбросить капли коротким центрифугированием и поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и удалить супернатант.

14. Поместить пробирку с открытой крышкой в термостат и инкубировать при 60 °С в течение 8-10 мин. для просушки и удаления остаточного этанола.

15. Внести в пробирку 60-100 мкл буфера для элюции. Тщательно ресуспендировать частицы пипетированием.

16. Инкубировать пробирку с закрытой крышкой в термостате при 60 °С в течение 10 мин., во время инкубирования 2-3 раза осторожно перемешать.

17. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки.

18. Перенести супернатант, содержащий выделенную ДНК, в новую пробирку. Проба готова к проведению ПЦР.

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

11. Возможные проблемы и их решение

1. Низкий выход или отсутствие ДНК в элюате, причина и возможное решение:

- неполный лизис.

Возможно, протеиназа К хранилась при высоких температурах в течение длительного времени. Необходимо повторить процедуру с использованием новых образцов и свежей протеиназы К.

Перед проведением процедуры следует убедиться, что образцы тщательно очищены. Остаточный формалин может ингибировать протеиназу К.

- Использование этилового спирта в концентрации ниже 95 %.

Повторить процедуру выделения с новыми образцами, используя 95% этиловый спирт. Нельзя использовать денатурированный спирт, который содержит другие вещества, такие как метанол или метилэтилкетон.

- Неверная подготовка «раствора для промывки №1» и «раствора для промывки №2».

Необходимо убедиться, что концентрированные растворы для промывки №1 и №2 были разбавлены необходимым количеством этилового спирта 95%, как изложено в п.9.

При кристаллизации какого-либо из растворов необходимо прогреть флакон с раствором при 50 °С и тщательно перемешать до полного растворения кристаллов и гомогенизации раствора.

2. Плохой выход ДНК в последующих ферментативных реакциях

- ДНК фрагментирована вследствие модификации формальдегида.

Хотя инкубация при 90°С удаляет большую часть модификаций формальдегида, ДНК, выделенная из FFPE-блоков, может не работать в ферментативных реакциях также хорошо, как ДНК, выделенная из свежей или замороженной ткани. Рекомендуется брать для ПЦР короткие ампликоны, <500 нуклеотидов.

- Низкая чувствительность.

Определить максимальный объем элюента, необходимого для проведения реакции амплификации. Соответственно подобрать

объем элюента, добавленного к реакции амплификации. Объем элюирования может быть подобран пропорционально.

- Растворы для промывки №1 и №2 не были хорошо перемешаны после хранения.

Солевые и этанольные компоненты растворов для промывки №1 и №2 могут быть разделены на фракции после длительного периода их хранения.

Необходимо всегда перед каждой процедурой выделения тщательно перемешивать раствор для промывки №1 и раствор для промывки №2.

- Недостаточная просушка осадка от остаточного этилового спирта.

После полного удаления супернатанта необходимо открыть крышку и инкубировать при температуре 60 °С в течение 10 мин. или до тех пор, пока весь остаточный этиловый спирт не испарится.

Остаточный этиловый спирт может снизить выход ДНК.

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

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение.

Набор реагентов «ДНК-Ткань-М» в упаковке предприятия-изготовителя должен храниться на складах поставщика в сухих проветриваемых помещениях.

Набор реагентов хранить при комнатной температуре 15-25 °С и относительной влажности воздуха до 90%. Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Протеиназу К следует хранить при температуре не выше -18 °С.

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

Транспортирование.

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

Набор реагентов транспортировать при температуре от +2 °С до +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 – 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 при условии хранения при комнатной температуре 15-25°С.

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

После разведения раствор протеиназы К следует хранить не более 6 месяцев при температуре не выше -18°С.

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 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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 СанПиН 2.1.3684-21

«Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» 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 производственного или бытового мусора.

Потребительская упаковка набора реагентов «ДНК-Ткань-М» 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 качество и безопасность набора реагентов «ДНК-Ткань-М» в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования и хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий, которые имеют признаки неблагоприятного события (инцидента), направлять информацию по адресу:

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

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

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-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 15.309-98	Системы разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения
ГОСТ Р 51088-2013	Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Общие технические условия.
ГОСТ Р 51352-2013	Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Методы испытаний.
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р 56894-2016	Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем(маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального применения
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для

	диагностики <i>in vitro</i> .
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
ГОСТ 2.114-2016	Единая система конструкторской документации. Технические условия.
ГОСТ 2.104-2006	Единая система конструкторской документации (ЕСКД). Основные надписи
ГОСТ Р 1.3-2018	Стандартизация в Российской Федерации. Технические условия на продукцию. Общие требования к содержанию, оформлению, обозначению и обновлению.

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.