



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«20» сентября 2018 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для выделения геномной ДНК
человека из фиксированных в формалине и
заключенных в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф)
по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016 в исполнениях:**

- 1) «ДНК-Ткань-Ф-50» на 50 выделений,**
- 2) «ДНК-Ткань-Ф-100» на 100 выделений**

Содержание

1. Назначение.....	3
2. Характеристики набора	5
3. Принцип действия.....	6
4 Аналитические и диагностические характеристики набора.....	7
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф»	7
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	8
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором	13
8. Анализируемые пробы	14
9. Подготовка компонентов набора для исследования	19
10. Проведение исследования.....	20
11. Возможные проблемы и их решение	23
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора	25
13. Утилизация	26
14. Гарантийные обязательства, контакты	27

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Назначение: набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) методом, основанном на связывании нуклеиновых кислот с силикатной мембраной в спин-колонке для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени выделенной геномной ДНК.

Область применения набора реагентов - клиническая лабораторная диагностика, онкология.

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

Функциональное назначение теста, выполняемого с помощью набора реагентов, состоит в выделении геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени выделенной геномной ДНК.

Принцип определения

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

ДНК из лизированных образцов сорбируется на мембране спин-колонки. Затем ДНК отмывается от хаотропных веществ и ингибирующих ПЦР примесей («Раствор для промывки №1 и №2»), после чего элюируется с мембраны («Элюент»).

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Целевой анализ – геномная ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков).

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, исследование ДНК и РНК, содержащихся в гистологическом материале, необходимо для научных исследований и становится частью рутинной диагностической практики.¹

Фиксация ткани и хранение её в виде парафинового блока — традиционный и рациональный способ работы с гистологическим материалом. Нуклеиновые кислоты, выделенные с соблюдением требуемых условий из ткани, залитой в парафиновый блок, могут быть использованы для ПЦР и ОТ-ПЦР, секвенирования, исследования на микрочипах и других молекулярно-биологических методик.¹

Специфическая патология, состояние или фактор риска, для обнаружения, определения или дифференцирования которого предназначено медицинское изделие для диагностики *in vitro* - Набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» не может использоваться для диагностики какой-либо патологии, состояния или фактора риска. Набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» используется для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени выделенной геномной ДНК.

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.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: Набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» рекомендуется использовать для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени выделенной геномной ДНК.

Противопоказания: отсутствуют.

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

Общее время проведения процедуры выделения ДНК из 1 образца составляет от 4ч 30 минут.

2.ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» выпускается в двух вариантах исполнения:

- 1) «ДНК-Ткань-Ф-50» на 50 выделений,
- 2) «ДНК-Ткань-Ф-100» на 100 выделений.

Состав набора

Набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» включает:

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

№ пп	Название реагента	Описание	Исполнение	
			«ДНК-Ткань-Ф- 50»	«ДНК-Ткань-Ф- 100»
1	Буфер для связывания ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон, (10 мл)	1 флакон, (20 мл)
2	Раствор для промывки №1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон, (25 мл)	1 флакон, (50 мл)
3	Раствор для промывки №2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон, (15 мл)	2 флакона, (по 15 мл)

№ пп	Название реагента	Описание	Исполнение	
			«ДНК-Ткань-Ф- 50»	«ДНК-Ткань-Ф- 100»
4	Протеиназа К	Белый порошок	1 флакон, (20 мг)	1 флакон, (40 мг)
5	Раствор для разведения протеиназы К	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон, (1 мл)	1 флакон, (2 мл)
6	Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон, (5 мл)	1 флакон, (10 мл)
7	Спин-колонок для связывания ДНК	Бесцветные полипропиленовые фильтрационные колонок с крышкой, с запрессованной стекловолоконной сорбирующей мембраной	50 колонок	100 колонок
8	Пробирки пластиковые объемом 2 мл	Бесцветные полипропиленовые пробирки без крышки	50 пробирок	100 пробирок

В наборе для выделения не используются калибраторы и контрольные материалы.

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

3. Принцип действия

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

ДНК из лизированных образцов сорбируется на мембране спин-колонок. Затем ДНК отмывается от хаотропных веществ и ингибирующих ПЦР примесей («Раствор для промывки №1 и №2»), после чего элюируется с мембраны («Элюент»).

4 Аналитические и диагностические характеристики набора

Таблица 2 – Аналитические характеристики набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф»

Концентрация выделенной ДНК из 30 мг фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани, нг/мкл, не менее	5
Чистота выделения ДНК, A260/280, не менее	1,6

По результатам проведенных клинических испытаний в серии из 144 попыток с образцами выделенной с помощью набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф» геномной ДНК подтверждены заявленные показатели функциональных свойств и эффективности медицинского изделия – концентрация выделенной ДНК из 30 мг фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани составляет не менее 5 нг/мкл, чистота выделения ДНК (A260/280) составляет не менее 1,6, и ДНК, выделенная из образцов фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани (FFPE-блоки), пригодна для последующего проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени - на уровне 0,984 (98,4 %) с доверительной вероятностью 90%.

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

В пограничную зону риска вошли опасности:

- потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях,
- утилизация набора с нарушением соответствующих мер безопасности и дезактивации,
- использование среза с FFPE-блока в количестве не достаточном для проведения процедуры выделения ДНК;
- кросс-контаминация образцов при подготовке срезов с парафиновых блоков;

- невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации, в следствии работы с набором неквалифицированным персоналом.

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-Ф) по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016 в исполнениях: 1) «ДНК-Ткань-Ф-50» на 50 выделений, 2) «ДНК-Ткань-Ф-100» на 100 выделений», 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-Ф» 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 3.

Таблица 3

Наименование реагента	Опасный компонент в составе	Пиктограмма опасности СГС	Фразы опасности	Предупредительные фразы
Буфер для связывания ДНК	Гуанидинтиоцианат 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	Гуанидинтиоцианат 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

Р 261	Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/тумана/паров/вещества в распылённом состоянии.
Р 264	После работы тщательно вымыть ...
Р 272	Не выносить загрязнённую одежду с места работы.
Р 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-Ф», 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 2.1.7.2790-10 «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.

ВНИМАНИЕ! Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 20-24 ч 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. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия)
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия)
6. Отдельный набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Eppendorf», Германия)
7. Холодильник от +2°С до +8°С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

Использование других материалов и реагентов, не входящие 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-Ф» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут оказать влияние на способность набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф» выделять геномную ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) соответствующего качества и количества, необходимого для проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени выделенной геномной ДНК.

Для того, чтобы оценить влияние потенциально интерферирующих веществ было выполнено исследование путем анализа воздействия каждого вещества в двух концентрациях (максимальной и минимальной), диапазон которых, как ожидается, будет встречаться при нормальном использовании набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф», на значения чистоты выделения ДНК (выраженную в отношении оптических плотностей раствора выделенной ДНК, $A_{260/280}$) и концентрации выделенной ДНК (выраженной в нг/мкл) с последующим проведением анализа методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени выделенной геномной ДНК.

Потенциально интерферирующие вещества и их концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Концентрация интерферирующих веществ, проверенных при исследовании влияния интерферирующих веществ

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация (мкл / 200 мкл раствора ДНК)	Минимальная концентрация (мкл / 200 мкл раствора ДНК)
Парафин (в ксилоле)	$2,00 \cdot 10^{-4}$	$5,00 \cdot 10^{-5}$
Ксилол	$2,00 \cdot 10^{-4}$	$5,00 \cdot 10^{-5}$
Этиловый спирт (95%)	$1,35 \cdot 10^{-3}$	$3,38 \cdot 10^{-4}$

Ни одно из потенциально интерферирующих веществ, оцениваемых при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов, не влияет на способность набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф» выделять геномную ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) соответствующего качества и количества, необходимого для проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени выделенной геномной ДНК.

ДНК, выделенная из срезов с FFPE-блоков, обычно более фрагментирована, чем ДНК, выделенная из свежих образцов тканей. Степень фрагментации и химической деградации зависит от условий фиксации и длительности хранения образца. Сильно фрагментированная и химически модифицированная ДНК, даже при относительно высокой концентрации в образце, может быть непригодна к амплификации в ПЦР.

8.3 Ограничения по использованию анализируемого материала:

Для оценки функциональных характеристик набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф» в зависимости от типа ткани человека было выполнено исследование путем проведения процедур выделения ДНК из фиксированных в формалине и заключенных в парафин

различных типов тканей человека в соответствии с инструкцией к набору.

Исследование проводили с использованием 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 составляет 30 мг. В каждом срезе с FFPE-блока площадь фрагмента фиксированной ткани должна составлять 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, A260/280) и концентрацию выделенной ДНК (выраженной в нг/мкл).

Результаты исследования представлены в Таблице 4.

Таблица 4 - Результаты исследования функциональных характеристик «ДНК-Ткань-Ф».

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

На основании полученных результатов процедуры выделения ДНК набором реагентов «ДНК-Ткань-Ф» 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 1,6, что является приемлемым для проведения дальнейшей ПЦР-реакции.

Критерии пригодности гистологических препаратов для выделения ДНК для 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.

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

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 Условия возможного хранения анализируемых образцов

Условия хранения пробы геномной ДНК человека, выделенной из образцов фиксированной в парафине ткани:

Полученная ДНК должна храниться при температуре от 2 °С до 8 °С и использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 часов раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре -20 °С.

Условия хранения фиксированных формалином и залитых парафином образцов ткани:

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

Условия хранения исходного клинического материала:

Условия хранения биопсийного материала, предназначенного для выделения ДНК²:

- при комнатной температуре — в течение 6 часов;
- при температуре 2–8 °С — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20 °С — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С — 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 одного из растворов, необходимо прогреть флакон с раствором при 50 °С и тщательно перемешать до полного растворения кристаллов и гомогенизации раствора.

Перед началом работы следует приготовить **«Раствор протеиназы К»**. Перенести весь объем «Раствора для разведения

² МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»

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-Ф-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-Ф-100»:

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 непосредственно перед выделением на срезы. 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.

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

2. Добавить **1200 мкл ксилола**. Инкубировать при комнатной температуре до тех пор, пока парафин полностью не растворится

(обычно около 2 мин). Закрывать крышку и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

3. Центрифугировать в течение 2 мин при 11000 g при комнатной температуре (15–25°C).

4. Удалить супернатант с помощью пипетки не затрагивая осадок.

5. К осадку **добавить 1200 мкл этилового спирта (95%)**. Перемешать на вортексе (5 сек).

Этиловый спирт экстрагирует остаточный ксилол из образца.

6. Центрифугировать в течение 2 мин при 11000 g при комнатной температуре (15–25°C).

7. Удалить супернатант с помощью пипетки 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.

9. Ресуспендировать осадок в **180 мкл «Буфера для связывания ДНК»** затем **добавить 20 мкл «Протеиназы К»**. Перемешать на вортексе (5 сек), без образования пены.

10. Инкубировать полученную смесь при 50°C в течение 3 часов, чтобы лизировать образец ткани.

Если после 3 часов инкубации видны нелизированные частицы ткани, добавить еще 10 мкл раствора протеиназы К и продолжить инкубацию еще на 3 часа или оставить на ночь.

11. Перемешать на вортексе (5 сек), затем еще **инкубировать 1 час** при 90 °C.

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.

12. Перемешать на вортексе (5сек). Поставить прогреваться «Элюент» при температуре 50°C.

13. Осторожно перенести весь получившийся объем смеси в спин-колонку с собирательной пробиркой объемом 2 мл, закрыть крышку. Центрифугировать при 6000g в течение 1 мин, отфильтрованную жидкость удалить с помощью дозатора или вакуумного отсоса.

При необходимости, центрифугировать несколько раз, до тех пор, пока весь раствор не пройдет через колонку.

14. Осторожно открыть спин-колонку и добавить **700 мкл «раствора для промывки №1»**, закрыть крышку. Центрифугировать при 6000g в течение 1 мин, отфильтрованную жидкость удалить.

15. Осторожно открыть спин-колонку и добавить **700 мкл «раствора для промывки №2»**, закрыть крышку. Центрифугировать при 6000g в течение 1 мин, отфильтрованную жидкость удалить.

16. Еще раз пропустить через колонку **700 мкл «раствора для промывки №2»**. Центрифугировать при 6000g в течение 1 мин. При необходимости, центрифугировать несколько раз, отфильтрованную жидкость удалить.

17. Просушить колонку центрифугированием. Центрифугировать при 12000g 1 мин.

18. Поместить колонку в 1,5 мл пробирку для **выделенной ДНК**. Открыть крышку колонки и добавить 60-100 мкл заранее прогретого «Элюента» в центр мембраны, чтобы обеспечить полное элюирование связанной ДНК.

Закрывать крышку и инкубировать при комнатной температуре (15-25 ° C) в течение 10-15 мин. Центрифугировать при 12000g в течение 2 мин. В пробирке находится раствор выделенной ДНК.

19. Проба готова к проведению ПЦР.

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 одного из растворов, необходимо прогреть флакон с раствором при 50 °С и тщательно перемешать до полного растворения кристаллов и гомогенизации раствора.

- Недостаточная просушка мембраны спин-колонки перед элюированием ДНК

Необходимо полностью высушить мембрану перед элюированием ДНК, для этого центрифугировать спин-колонку при 12000g в течение 1 мин.

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 элюата, необходимого проведения реакции амплификации. Соответственно подобрать объем элюата, 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°C в течение 10 мин или до тех пор, пока весь остаточный этиловый спирт не испарится.

Остаточный этиловый спирт может снизить выход ДНК.

3. Забивание мембраны

- Неполный лизис вызвал забивание мембраны.

Увеличьте время лизиса, чтобы полностью лизировать образец. Если после 3 часов инкубации видны нелизированные частицы ткани, необходимо добавить еще 10 мкл раствора протеиназы К и продолжить инкубацию еще на 3 часа или оставить на ночь.

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-Ф» в упаковке предприятия-изготовителя должен храниться на складах поставщика в сухих проветриваемых помещениях.

Набор реагентов хранить при комнатной температуре 15-25°C 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°C.

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

Транспортирование.

Транспортировать набор реагентов «ДНК-Ткань-Ф» 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-Ткань-Ф» 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°C.

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

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

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-Ткань-Ф» 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-Ткань-Ф» требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

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, Инженерный 44-й проезд, дом 9

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

Тел.: +7 927 737 83 40

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.