



351-6 2022-04-21



ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери

ПРОБА-НК-ФЕТ

Регистрационное удостоверение

№ РЗН 2017/5309 от 30 января 2017 года

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 НАЗНАЧЕНИЕ	4
2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА	5
3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	6
4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	7
5 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	8
6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	9
7 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	11
8 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	12
9 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	12
10 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ.....	12
11 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	13

ВВЕДЕНИЕ

Неинвазивная пренатальная молекулярно-генетическая диагностика

В акушерско-гинекологической практике часто возникает необходимость определения генотипа плода на ранних сроках беременности. До недавнего времени материал для таких исследований получали инвазивно при хорион-, плацентобиопсии и в ходе амнио- и кордоцентеза. Риск самопроизвольного прерывания беременности в этом случае составляет 2-3%. Открытие наличия фетальных ДНК и РНК в материнской крови послужило основой для развития неинвазивной пренатальной диагностики, которая в отличие от прежних методов, не представляет угрозы течению беременности, т.к. материалом для исследования служит кровь матери. Фетальная ДНК, т.е. ДНК плода, обнаруживается в крови беременной женщины, её количество возрастает с увеличением срока гестации, зависит от состояния плаценты и особенностей течения беременности.

Начиная с 8-10 недель беременности, методы неинвазивной пренатальной молекулярно-генетической диагностики позволяют проводить исследование фетальной ДНК с точностью 96-100%.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1** Настоящая инструкция распространяется на комплект реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери ПРОБА-НК-ФЕТ.
- 1.2** Комплект реагентов предназначен для выделения фетальной ДНК (ДНК плода) из крови матери.
- 1.3** Комплект может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 Состав комплекта реагентов

- Лизирующий раствор – 1 флакон (15 мл);
- Реагент для преципитации – 1 флакон (30 мл);
- Промывочный раствор № 1 – 1 флакон (25 мл);
- Промывочный раствор № 2 – 1 флакон (15 мл);
- Буфер для растворения – 2 пробирки (по 1,4 мл);
- Депротеинизирующий раствор – 1 пробирка (1,0 мл);
- Отрицательный контрольный образец – 1 флакон (13,5 мл).

2.2 Количество анализируемых образцов

Комплект рассчитан для выделения фетальной ДНК из 50 анализируемых образцов (включая отрицательные контрольные образцы).

2.3 Принцип метода

Принцип действия основан на высвобождении нуклеиновых кислот под действием хаотропного агента, с последующим осаждением и очисткой нуклеиновых кислот от примесей.

2.5 Время проведения выделения ДНК: от 2 ч.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, 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», с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

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

Подготовку и проведение исследования с использованием комплекта реагентов следует проводить в боксах биологической безопасности II или III класса биологической защиты.

Дозаторы, используемые при работе с набором реагентов, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

При использовании комплекта реагентов в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы, которые относятся к классу В и утилизируются 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».

Промывочный раствор № 1, входящий в состав комплекта реагентов ПРОБА-НК-ФЕТ, содержит раствор изопропанола¹ (указание на риски: H225, H319, H336).

Промывочный раствор № 2, входящий в состав комплекта реагентов ПРОБА-НК-ФЕТ, содержит метилацетат² (указание на риски: H225, H319, H336).

Отрицательный контрольный образец, входящий в состав комплекта реагентов ПРОБА-НК-ФЕТ, содержит азид натрия (консервант) в концентрации меньше 0,06 %, что является безопасным для конечного пользователя.

При работе с комплектом реагентов необходимо использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и

¹ - H225 – Легковоспламеняющиеся жидкость и пары; H319 – вызывает раздражение глаз; H336 – Может вызывать сонливость и головокружение.

² - H225 – Легковоспламеняющиеся жидкость и пары; H319 – вызывает раздражение глаз; H336 – Может вызывать сонливость и головокружение.

слизистой оболочкой. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не использовать комплект реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов указанному в паспорте к комплекту;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов комплекта;
- по истечению срока годности комплекта.

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

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с комплектов реагентов ПРОБА-НК-ФЕТ требуются следующие оборудование и материалы:

- центрифуга для пробирок объёмом 4,5 мл, с RCF(g) не ниже 1150, например, центрифуга EBA 20 Hettich (RCF(g) 3461 или 6000 об/мин);
- центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF(g) не ниже 17000, например, центрифуга HERAEUS pico17 (RCF(g) 17000 или 13300 об/мин);
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 65 °С до 98 °С;
- микроцентрифуга-вортекс, например BioSan, Латвия или аналогичная;
- холодильник бытовой с морозильной камерой Стинол, Россия или аналогичный;
- насос с колбой-ловушкой для удаления надсадочных жидкостей;
- контейнер для замораживания, например, штатив IsoFreeze 24x1,5/2 мл, SSI, или штатив CoolRack M15, 15x1,5/2 мл, Biocision, или другое аналогичное оборудование;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл, например SSI, США;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости 2–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл например Eppendorf, Германия или аналогичные;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл, например Ахуген, США или аналогичные;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

5 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

5.1 Материал для исследования

Взятие цельной периферической крови

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

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

5.2 Транспортировка и хранение исследуемого материала

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

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

5.3 Получение плазмы крови

Центрифугируйте пробирки с кровью при RCF(g) 1150-2000 в течение 20 мин при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

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

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

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

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

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

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед началом работы необходимо достать из холодильника комплект реагентов для выделения фетальной ДНК ПРОБА-НК-ФЕТ и проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе. В случае выпадения осадка лизирующий раствор следует прогреть при 65 °С до полного растворения осадка. Пробирку с депротеинизирующим раствором необходимо выдержать при комнатной температуре 15-20 минут, затем перемешать в течение 10-15 с и центрифугировать в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

На данном этапе используйте только наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.

6.1 Подготовьте к выделению фетДНК образцы плазмы, полученные в соответствии с п. 5.3 (при необходимости разморозьте при комнатной температуре).

6.2 Промаркируйте одну пробирку объёмом 1,5 мл «К-» и внесите в неё 900 мкл отрицательного контрольного образца.

6.3 Добавьте в каждую предназначенную для выделения ДНК пробирку с плазмой и в пробирку «К-» по 18 мкл депротеинизирующего раствора.

ВНИМАНИЕ! Депротеинизирующий раствор обладает повышенной вязкостью, поэтому его необходимо набирать в наконечник пипетки в течение 3-5 с и наносить на стенку пробирки (отдельным наконечником для каждого образца).

6.4 Плотно закройте крышки пробирок, встряхните пробирки на вортексе в течение 10-20 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

6.5 Термостатируйте при температуре 98 °С в течение 5 мин.

ВНИМАНИЕ! При прогревании пробирок возможно открывание крышек! Рекомендуется использовать пробирки с защёлкивающимися крышками (например, Eppendorf Safe-Lock Tubes) или программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, термостат ТТ-1 «ДНК-Техн.» производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

Примечание – В случае если не используется специализированный штатив, необходимо подготовить ледяную баню. Ледяная баня состоит из ёмкости, в которую насыпается кусковой лед из воды, помещается штатив для пробирок с открытым дном и наливается холодная вода. Ледяная смесь не должна доходить до крышек пробирок приблизительно 5 мм.

6.6 Поместите пробирки в охлаждающий штатив на 10 мин.

ВНИМАНИЕ! Пробирки необходимо перенести в штатив сразу после термостатирования! Хранение пробирок не допускается, поскольку может привести к получению недостоверных результатов.

6.7 Осушите пробирки бумажной салфеткой. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 17000 в течение 25 мин при комнатной температуре.

- 6.8** Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-» по новой пластиковой пробирке объёмом 1,5 мл.
- 6.9** Отберите по 300 мкл супернатанта (из пробирки, маркированной «К-», 300 мкл раствора) и перенесите в соответствующие промаркированные пробирки.
- ВНИМАНИЕ!** Если объём супернатанта менее 300, но более 100 мкл, отберите и перенесите весь объём. Если объём супернатанта менее 100 мкл, то, возможно, предыдущие этапы выделения фетДНК проведены некорректно (неправильные условия хранения крови или плазмы, несоответствие скоростных и временных условий центрифугирования образцов, несоблюдение температурных режимов). В этом случае необходимо провести повторное выделение фетДНК из дополнительной пробирки с плазмой или повторное взятие крови у пациентки.
- 6.10** Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки. Закройте крышки пробирок.
- 6.11** Встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с, осадите капли центрифугированием на вортексе в течение 30 с.
- 6.12** Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 15 мин, осадите конденсат центрифугированием на вортексе в течение 30 с.
- 6.13** Добавьте в каждую пробирку по 600 мкл реагента для преципитации, встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- ВНИМАНИЕ!** После добавления реагента для преципитации, пробирки необходимо выдержать в горизонтальном положении в течение 7-10 мин, однократно встряхнув на микроцентрифуге-вортексе в течение этого времени.
- 6.14** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 17000 в течение 15 мин при комнатной температуре.
- 6.15** Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.16** Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора № 1 и перемешайте на вортексе в течение 3-5 с.
- 6.17** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 17000 в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 6.18** Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.19** Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора № 2 и перемешайте на вортексе в течение 3-5 с.
- 6.20** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 17000 в течение 5 мин при комнатной температуре.

- 6.21** Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.22** Откройте крышки пробирок и высушите осадок при температуре 65 °С в течение 1 мин.
- 6.23** Добавьте к осадку 35 мкл буфера для растворения, закройте крышки и прогрейте пробирки при температуре 65 °С в течение 10 мин. Перемешайте на вортексе в течение 3-5 с.
- 6.24** Осадите капли центрифугированием пробирок при RCF(g) 17000 в течение 30 с при комнатной температуре.

Полученный препарат ДНК готов для проведения ПЦР. Препарат ДНК можно хранить при температуре минус 20 °С не более 3 месяцев или при температуре минус 70 °С не более 1 года.

7 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

7.1 Транспортирование

- 7.1.1 Транспортирование комплекта осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов, входящих в состав комплекта.
- 7.1.2 Комплекты реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

7.2 Хранение

- 7.2.1 Комплект реагентов следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.
- 7.2.2 Комплекты реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

7.3 Указания по эксплуатации

- 7.3.1 Комплект реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.
- 7.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:
- компоненты комплекта следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.








8 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 8.1** При использовании комплекта реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684 и МУ 1.3.2569.
- 8.2** Комплекты реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684.





9 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

10 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Каталожный номер
	Количество тестов		Адрес изготовителя
	Годен до		Не стерильно
	Серия комплекта реагентов		Не допускается воздействие солнечного света
	Дата изготовления		

Символы и обозначения опасности при маркировке комплекта реагентов

	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Легковоспламеняемое
	Вызывает раздражение глаз
	Содержит азид натрия < 0,06%

11 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

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

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

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

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов ПРОБА-НК-ФЕТ, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:

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

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

E-mail: hotline@dna-technology.ru

ДНК-Технология

117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное,
ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12

Тел./факс +7 (495) 640-17-71

Служба клиентской поддержки:

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

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

E-mail: hotline@dna-technology.ru