ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

Инструкция по применению
ПРОБА-ОПТИМА

Организация-производитель

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «ДНК-Технология ТС»

_____ С.А. Самарин

«13» _____ 2022 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НПФ ДНК-Технология»

_____ С.П. Левичев

«13» _____ 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов

для выделения ДНК человека, бактерий, вирусов и грибов

из биологического материала человека и культур микроорганизмов

(ПРОБА-ОПТИМА)

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ ТС»
САМАРИН С.А.
ПОДПИСЬ

2022 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ЭДТА	- соль этилендиаминтетраацетата
ИВ	- интерферирующие вещества
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ВК	- внутренний контроль
К+	- положительный контрольный образец
К-	- отрицательный контрольный образец

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 **Полное наименование набора реагентов:** Набор реагентов для выделения ДНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека и культур микроорганизмов (ПРОБА-ОПТИМА), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 **Назначение**: набор реагентов предназначен для выделения ДНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека (кровь; буккальный эпителий, мазки/соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального трактов; моча; фекалии; биоптаты; амниотическая жидкость; эякулят; ликвор; молоко), а также культур микроорганизмов (бактерий и грибов), полученных из этого биоматериала, с целью последующего анализа методом ПЦР.

1.3 **Функциональное назначение:** вспомогательное средство для диагностики *in vitro*.

1.4 **Показания к проведению анализа:** выделение ДНК человека, бактерий, вирусов и грибов для последующего анализа методом ПЦР.

1.5 **Противопоказания к применению**: Противопоказаний к применению нет.

1.6 **Популяционные и демографические аспекты**: применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.7 **Область применения:** набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

1.8 **Потенциальные пользователи:** квалифицированный персонал, осуществляющий взятие и предобработку клинического материала, а также специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

1.9 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

Набор реагентов выпускается в следующих вариантах исполнения:

ПРОБА-ОПТИМА МАКС выпускается в фасовке для ручного дозирования (маркируется «Фасовка N») и включает следующие компоненты:

REF **Р-015-N/2, фасовка N**			
Компоненты набора реагентов	Внешний вид	Количество флаконов\ пробирок	Номинальный объем
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон	20 мл
Нейтрализующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл
Промывочный раствор СК	Прозрачная бесцветная пенящаяся жидкость	1 флакон	35 мл
Промывочный раствор Р	Прозрачная бесцветная жидкость	2 флакона	по 35 мл
Отрицательный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон	12,5 мл

ПРОБА-ОПТИМА выпускается в фасовке для ручного дозирования (маркируется «Фасовка N» и «Фасовка S») и включает следующие компоненты:

REF **Р-016-1/2, фасовка S**			
Компоненты набора реагентов	Внешний вид	Количество флаконов\ пробирок	Номинальный объем
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	50 пробирок	по 400 мкл
Нейтрализующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

REF P-016-N/2, фасовка N			
Компоненты набора реагентов	Внешний вид	Количество флаконов\ пробирок	Номинальный объем
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон	20 мл
Нейтрализующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	400 мкл

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

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов предназначен для однократного применения и рассчитан на выделение ДНК из 50 анализируемых образцов (включая отрицательные контрольные образцы).

2.3 Принцип метода

Принцип метода заключается в щелочном лизисе клеток, происходящем в ходе термического инкубирования.

Эффективность такого выделения ДНК из биологического материала приближается к максимально возможному в связи с тем, что используется высокотемпературная обработка образцов в лизирующем растворе, а потери минимизированы.

2.4 Время проведения выделения нуклеиновых кислот: **от 25 минут**. Время зависит от исследуемого материала, количества образцов в одновременном выделении ДНК, используемого оборудования.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Рекомендуемое количество биоматериала, из которого может быть получен препарат ДНК: от 5,0 до 1000 мкл [1].

Выход ДНК (эффективность) составляет 440 - 680 нг [2].

Объём получаемого препарата ДНК: от 100 до 450 мкл.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие в образцах биологического материала интерферирующих веществ может влиять на пробоподготовку, снижая качество и количество выделенной ДНК; являться причиной сомнительных (недостоверных) и/или ложноотрицательных результатов; а также ингибировать ПЦР.

Для изучения влияния некоторых веществ на пробоподготовку и тем самым способными искажать результаты ПЦР-анализа проведено одновременное выделение ДНК из биологического материала без и с добавлением тестируемых интерферентов в концентрациях, превышающих потенциально возможные для данных образцов.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось ингибирование ПЦР, представлены в таблице ниже.

Вид биоматериала	**Интерферирующее вещество**	**Исследованная концентрация в образце**
Эндогенные вещества		
Кровь, фекалии, моча, мазки/соскобы из желудочно-кишечного тракта, амниотическая жидкость	Билирубин	171 мкмоль/л
Кровь, фекалии, мазки/соскобы из желудочно-кишечного тракта, амниотическая жидкость	Холестерин	13 ммоль/л
Мазки/соскобы из желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей, фекалии, моча, биоптаты, амниотическая жидкость	Гемоглобин*	1 %
Буккальный эпителий, биоптаты, эякулят, мазки/соскобы из урогенитального тракта и дыхательных путей	Слизь (муцин)	5 %
Экзогенные вещества		
Кровь	ЭДТА	до 2,0 мг/мл [3]
Мазки/соскобы из дыхательных путей,	Назонекс	5%

[1] функциональные показатели зависят от вида и количества биоматериала;

[2] выход ДНК приведен для выделения из крови объемом 100 мкл с содержанием лейкоцитов от 5,5 x 10^9/л до 7,8 x10^9/л.

[3] Согласно ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калия ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл.

*для образцов биоматериала, выделяемых с использованием набора реагентов в варианте исполнения ПРОБА-ОПТИМА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Вид биоматериала	Интерферирующее вещество	Исследованная концентрация в образце
буккальный эпителий		
Мазки/соскобы из дыхательных путей, буккальный эпителий	Пиносол	5%
Мазки/соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального трактов, моча, фекалии, биоптаты, амниотическая жидкость, эякулят, ликвор, молоко, буккальный эпителий	Хлоргексидина биглюконат	5%
Буккальный эпителий, мазки/соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального трактов; моча, молоко	Октенисепт	5%

При добавлении гепарина в образцы биоматериала (кровь) ингибирование ПЦР наблюдалось при минимально исследованной концентрации интерферента равной 110 МЕ/дл.

Для снижения количества биологических образцов с ИВ необходимо выполнять правила их взятия.

В связи с тем, что в методике, лежащей в основе пробоподготовки ПРОБА-ОПТИМА, для некоторых видов биологического материала рекомендовано его взятие непосредственно в лизирующий раствор, важно соблюдать их соотношение. Если объём осадка составляет больше трети всего объёма образца в лизирующем растворе, эффективность выделения ДНК может снижаться.

В каждом наборе реагентов для амплификации для оценки качества экстракции ДНК и возможного ингибирования ПЦР предусмотрен внутренний контроль. Признаком полного ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации ВК и специфических продуктов.

3.3 Эффективность набора реагентов

Эффективность набора реагентов ПРОБА-ОПТИМА установлена в ходе проведения клинических испытаний с использованием дополнительных наборов реагентов для амплификации при исследовании образцов биологического материала.

Вид биоматериал	Количество исследованных образцов, шт.	Набор реагентов для амплификации (сокращенное наименование)	Эффективность набора реагентов ПРОБА-ОПТИМА
Амниотическая жидкость	16	КВМ*	100 % ($P_{ист}$ = 86,6)
Биоптаты	12	Streptococcus agalactiae	100 % ($P_{ист}$ = 82,54)
Буккальный эпителий	30	КВМ*	100 % ($P_{ист}$ = 92,61)
Кровь	36	ЦМВ-ГЕН	100 % ($P_{ист}$ = 93,8)
	40	КВМ*	100 % ($P_{ист}$ = 94,41)
Ликвор	16	Streptococcus agalactiae	100 % ($P_{ист}$ = 86,6)
Мазки/соскобы из дыхательных путей	23	КАНД-ГЕН	100 % ($P_{ист}$ = 90,47)
Мазки/соскобы из желудочно-кишечного тракта	27	КАНД-ГЕН	100 % ($P_{ист}$ = 91,83)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Вид биоматериал	Количество исследованных образцов, шт.	Набор реагентов для амплификации (сокращенное наименование)	Эффективность набора реагентов ПРОБА-ОПТИМА
Мазки/соскобы из урогенитального тракта	41	ПЛАЗМОГЕН-Мх	100 % ($P_{ист}$ = 94,54)
Молоко	32	ЦМВ-ГЕН	100 % ($P_{ист}$ = 93,06)
Моча	35	ЦМВ-ГЕН	100 % ($P_{ист}$ = 93,63)
	22	Streptococcus agalactiae	100 % ($P_{ист}$ = 90,06)
Фекалии	23	КАНД-ГЕН	100 % ($P_{ист}$ = 90,47)
Эякулят	38	ПЛАЗМОГЕН-Мх	100 % ($P_{ист}$ = 94,12)
Культуры микроорганизмов	43	МикозоСкрин	100 % ($P_{ист}$ = 94,79)
	12	Streptococcus agalactiae	100 % ($P_{ист}$ = 82,54)
Общая эффективность набора реагентов ПРОБА-ОПТИМА	446	**100 % (Рист = 99,49)**	
*Количество выделенной геномной ДНК было достаточным для проведения дальнейших исследований методом ПЦР			

В клинических испытаниях набор реагентов был испытан в комплексе со следующими изделиями:

Набор реагентов для выявления ДНК цитомегаловируса человека (CMV) методом полимеразной цепной реакции (ЦМВ-ГЕН) по ТУ 9398-005-46482062-2008, ООО «НПО ДНК Технология», Россия, РУ № ФСР 2008/03945.

Набор реагентов для выявления ДНК микоплазмы хоминис (Mycoplasma hominis) методом полимеразной цепной реакции (ПЛАЗМОГЕН-Мх) по ТУ 9398-439-46482062-2008, ООО «НПО ДНК Технология», Россия, РУ № ФСР 2008/02551.

Набор реагентов для выявления ДНК кандиды альбиканс (Candida albicans) методом полимеразной цепной реакции (КАНД-ГЕН) по ТУ 9398-002-46482062-2008, ООО «НПО ДНК Технология», Россия, РУ № ФСР 2008/03847.

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени (КВМ) по ТУ 9398-036-46482062-2009, ООО «НПО ДНК Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08412.

Набор реагентов для выявления ДНК Streptococcus agalactiae методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени (Streptococcus agalactiae), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/14309.

Набор реагентов для выявления и типирования возбудителей грибковых инфекций рода Candida, Malassezia, Saccharomyces и Debaryomyces методом ПЦР в режиме реального времени (МикозоСкрин) по ТУ 21.20.23-104-46482062-2018, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/11088.

3.4 Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость

Внутрисерийная воспроизводимость – 100 % (86,28-100).

Межсерийная воспроизводимость - 100 % (86,28-100).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Подготовка к выделению ДНК и выделение ДНК из образцов биологического материала должны проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические ПЦР исследования клинического материала с соблюдением требований 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 и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька. При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СанПиН 3.3686-21.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

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

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

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

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

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных правилами и нормами СанПиН 3.3686-2021.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится выделение НК и постановка ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые 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».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасного компонента	Указание на риски	Меры безопасности
Лизирующий раствор	**Щелочь**	H302, H315, H319	P280, P301+P330+P312, P302+P352, P305+P351+P338, P308+P313, P501
Нейтрализующий раствор	Нет опасных веществ	-	-
Промывочный раствор Р	Нет опасных веществ	-	-
Промывочный раствор СК	**Щелочь**	H302, H315, H319	P280, P301+P330+P312, P302+P352, P305+P351+P338, P308+P313, P501
	ПАВ	H302, H314, H319, H412	P264, P280, P301+P330+P312, P302+P352, P305+P351+P338, P273, P501
Отрицательный контрольный образец	Нет опасных веществ	-	-

Расшифровка обозначений: H302: Вредно при проглатывании; H314: При попадании на кожу и глаза вызывает химические ожоги; H315: Вызывает раздражение кожи; H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение; H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями; P264: После работы тщательно вымыть руки; P280: Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/средствами защиты глаз/лица; P301+P330+P312: ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: Прополоскать рот и обратиться за медицинской помощью при плохом самочувствии; P302+P352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промыть большим количеством воды; P305+P351+P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь, и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз; P308+P313: ПРИ оказании воздействия или обеспокоенности: Обратиться к врачу; P273: Не допускать попадания в окружающую среду; P501: Удалить содержимое/упаковку в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

При работе с набором реагентов следует использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, не глотать. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц. При контакте промыть пораженное место большим количеством воды и обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключён.

Не допускается использовать набор реагентов:

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

Примечание – Набор 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- бокс биологической безопасности II класса;
- микроцентрифуга-вортекс;
- центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF более 16000 x g (соответствует 13000 об/мин на центрифуге Heraeus Pico 17 или аналогичной);
- термостат твердотельный с прижимной крышкой, поддерживающий температуру 90 °С (например, ТТ-1- «ДНК-Техн.» ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, или аналогичный), и пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз,

или термостат твердотельный, поддерживающий температуру 90 °С (например, ТТ-2 «Термит» ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, или аналогичный), и пробирки объёмом 1,5 мл с защёлкивающимися крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз, например, Eppendorf Safe-Lock Tubes;

- холодильник;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл;
- штатив для дозаторов;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от ДНКаз и РНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- электрический лабораторный аспиратор с колбой - «ловушкой»;
- одноразовые наконечники без фильтра для аспиратора, свободные от ДНКаз и РНКаз, объёмом 200 мкл;
- физиологический раствор стерильный или транспортная среда (Транспортная среда для биопроб СТОР-Ф по ТУ 21.20.23-101-46482062-2019, производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640), при необходимости;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- дезинфицирующее средство.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют кровь; буккальный эпителий, мазки/соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального трактов; мочу; фекалии; биоптаты; амниотическую жидкость; эякулят; ликвор; молоко, а также культуры микроорганизмов (бактерий и грибов), полученных из этого биоматериала.

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 и СанПиН 3.3686-21.

6.2 Общие рекомендации

6.2.1 Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала человека необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса. Решение о необходимости исследовать ту или иную локализацию принимает лечащий врач на основании собранного анамнеза и клинической картины заболевания.

6.2.2 Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

6.2.3 При необходимости взятия биоматериала из нескольких биотопов повторите процедуру, каждый раз забирая материал новым зондом в новую пробирку.

6.2.4 Неправильное взятие биоматериала может привести к получению недостоверных результатов и, вследствие этого, необходимости его повторного взятия.

6.2.5 На этапе подготовки биоматериала используйте наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.

6.2.6 При добавлении раствора в пробирку, содержащую биологический материал, вносите раствор аккуратно, не касаясь стенок пробирки. При касании стенки пробирки смените наконечник.

6.2.7 Наконечник следует менять при каждом удалении раствора из образца.

6.2.8 Для предотвращения контаминации всегда открывайте крышку только той пробирки, с которой идёт работа (внесение образца/реактива, удаление надосадочной жидкости), и закрывайте её после этого. Не допускается работать одновременно с

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

несколькими пробирками с открытыми крышками.

6.3 Взятие материала на исследование

6.3.1 Периферическая кровь

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объёмом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. Для перемешивания крови с ЭДТА после взятия материала необходимо плавно перевернуть пробирку не менее 8-10 раз.

В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия (если это не противоречит требованиям к ПЦР-набору реагентов, применяемому совместно с набором реагентов в варианте исполнения ПРОБА-ОПТИМА МАКС).

При проведении клинических испытаний были валидированы Пробирки вакуумные VACUETTE, Greiner Bio-One GmbH, Австрия (РУ № ФСЗ 2011/09314).

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

Ограничение метода: внутривенные инъекции гепарина, инфузии препаратов для парентерального питания – менее чем за 6 часов до исследования.

6.3.2 Буккальный эпителий

ВНИМАНИЕ! **Взятие материала осуществляется сухим зондом!** Необходимо **исключить** контакт растворов с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Забор материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий, имеющих регистрационные удостоверения и предназначенных для соответствующего вида биоматериала. В ходе клинических испытаний производителем было валидировано следующее медицинское изделие: Зонд медицинский одноразовый стерильный по ТУ 32.50.13-002-28731857-2020, ООО «ФармМедПолис РТ», Россия, (РУ № РЗН 2021/13989).

За два часа перед взятием биологического материала не рекомендуется употреблять пищу, курить, перорально использовать лекарственные средства. Перед взятием материала дважды прополощите рот чистой водой.

После взятия биологического материала перенесите зонд в одноразовую пробирку объёмом 1,5 мл, в которую предварительно внесено 400 мкл лизирующего раствора, и тщательно промойте его в жидкости в течение 10–15 с, избегая её разбрызгивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Извлеките зонд из раствора и, вращательным движением прижимая его к внутренней стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости. Полностью удалите зонд из пробирки и утилизируйте.

Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

6.3.3 Мазки\соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта

ВНИМАНИЕ! **Взятие материала осуществляется сухим зондом!** Необходимо **исключить** контакт растворов с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью. Взятие материала осуществляется с помощью специальных стерильных одноразовых инструментов – зондов, цитощеток или тампонов, в зависимости от источника биологического материала согласно установленной процедуре.

Взятие материала проводится в одноразовые пробирки объёмом 1,5 мл, в которые предварительно внесено по 400 мкл лизирующего раствора.

Примечание - Взятие материала при необходимости возможно проводить в одноразовые пробирки объёмом 1,5 мл, в которые предварительно внесено по 500 мкл стерильного физиологического раствора или транспортной среды (Транспортная среда для биопроб СТОР-Ф по ТУ 21.20.23-101-46482062-2019, производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640).

После взятия материала перенесите зонд в пробирку с лизирующим раствором или транспортной средой и тщательно промойте его в жидкости в течение 10–15 с, избегая её разбрызгивания.

Извлеките зонд из раствора и, вращательным движением прижимая его к внутренней стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости. Полностью удалите зонд из пробирки и утилизируйте.

Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

Примечание - Взятие материала при необходимости возможно проводить в транспортную среду для жидкостной цитологии PreservCyt ThinPrep (Hologic Inc, США, РУ № ФСЗ 2012/11750). Взятие биологического материала проводят согласно инструкции производителя.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6.3.4 Моча

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве не меньше 20–30 мл. Отбор мочи проводят в сухой стерильный контейнер объёмом до 60 мл, снабженный герметично завинчивающейся крышкой.

После сбора мочи контейнер плотно закрывают и маркируют.

6.3.5 Фекалии

Для анализа используют пробы фекалий массой (объёмом) примерно 1–3 г (1–3 мл). Пробу переносят отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками в специальный стерильный сухой флакон в количестве 1,0 г (примерно).

После сбора фекалий флакон плотно закрывают и маркируют.

6.3.6 Биоптаты

Взятие материала осуществляют согласно утвержденной процедуре в одноразовую пробирку объёмом 1,5 мл, в которую предварительно внесено 400 мкл лизирующего раствора.

ВНИМАНИЕ! Максимальный размер фрагмента ткани - 5,0 мм по длине большей стороны или в диаметре.

6.3.7 Амниотическая жидкость

Взятие амниотической жидкости производят согласно утвержденной процедуре в ходе процедуры амниоцентеза. Отбор материала проводят в сухой стерильный контейнер, снабженный герметично завинчивающейся крышкой, в количестве не менее 1,0-2,0 мл.

После сбора контейнер плотно закрывают и маркируют.

6.3.8 Эякулят

Сбор эякулята проводят согласно утвержденной процедуре в специальный сухой стерильный контейнер объёмом до 60 мл, снабженный герметично завинчивающейся крышкой.

После сбора контейнер плотно закрывают и маркируют.

6.3.9 Ликвор

Взятие спинномозговой жидкости (ликвора) осуществляется согласно установленной процедуре одноразовыми иглами в одноразовые пробирки объёмом 1,5 мл в количестве не менее 500-1000 мкл.

После взятия материала пробирку плотно закрывают и маркируют.

6.3.10 Молоко

Сбор грудного молока проводят согласно утвержденной процедуре в специальный

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

сухой стерильный контейнер объёмом до 60 мл, снабженный герметично завинчивающейся крышкой.

После сбора контейнер плотно закрывают и маркируют.

6.3.11 Культуры микроорганизмов

Взятие материала с жидких и плотных сред осуществляется при помощи одноразовой микробиологической петли или шпателя. Поместите в одноразовую пробирку объёмом 1,5 мл, в которую предварительно внесено 400 мкл лизирующего раствора, от 5,0 мкл одиночной колонии клеток или до 50 мкл жидкой среды.

Примечание – Взятие материала (одиночная колония клеток или 100 мкл жидкой среды) при необходимости производится в одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5-2,0 мл, в которую предварительно внесено 500 мкл стерильного физиологического раствора.

Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

6.4 Транспортирование и хранение исследуемых образцов

6.4.1 Цельная кровь

Образцы крови допускается транспортировать и хранить:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 6 часов с момента взятия материала для исследования на наличие ДНК микроорганизмов в крови;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 30 дней с момента взятия материала для исследования генетических полиморфизмов человека.

ВНИМАНИЕ! Цельную кровь нельзя замораживать.

6.4.2 Мазки/соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, буккальный эпителий, биоптаты, культуры микроорганизмов

6.4.2.1 При взятии буккального эпителия, мазков\соскобов из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, культур микроорганизмов, биоптатов в **лизирующий** раствор образцы допускается хранить и транспортировать:

- при температуре от 20 °С до 25 °С – не более 48 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 30 дней;
- при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С – не более 90 дней.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

6.4.2.2 При взятии мазков\соскобов из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, культур микроорганизмов **в транспортную среду** для биопроб

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СТОР-Ф или в стерильный физиологический раствор, образцы допускается хранить и транспортировать:

- при температуре от 18 °С до 25 °С - не более 48 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С - не более 7 суток.

6.4.2.3 При взятии мазков\соскобов из урогенитального тракта **в транспортную среду** для жидкостной цитологии PreservCyt ThinPrep (Hologic Inc, США) условия транспортирования и хранения определяются инструкцией производителей.

6.4.3 Моча:

Нативные и предварительно обработанные образцы мочи допускается транспортировать и хранить:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более одних суток;
- при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С – не более одной недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

6.4.4 Амниотическая жидкость, эякулят, ликвор, грудное молоко

Образцы амниотической жидкости, эякулят, ликвор, грудное молоко допускается транспортировать и хранить:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более одних суток;
- при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С – не более одной недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

6.4.5 Образцы нативных фекалий

Образцы нативных фекалий допускается транспортировать и хранить:

- при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) – не более 6 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 3 суток.

6.5 Подготовка биологического материала для исследования

Перед выделением ДНК требуется предварительная обработка некоторых видов биологического материала: мазки/соскобы, взятые в физиологический раствор или транспортную среду; моча; амниотическая жидкость, ликвор; фекалии; эякулят; молоко, культуры микроорганизмов.

ВНИМАНИЕ! Подробная процедура предварительной обработки описана в разделах пробоподготовки соответствующих видов материалов (7.2.4.1-7.2.4.5).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7 ПРОВЕДЕНИЕ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

7.1 Общие рекомендации

7.1.1 На этапах подготовки биоматериала и выделении из него ДНК используйте одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.

7.1.2 Удалять надосадочную жидкость из каждой пробирки следует отдельным наконечником.

7.1.3 При добавлении реагентов в пробирку, содержащую биологический материал, вносите их аккуратно, не касаясь стенок пробирок. При касании стенки пробирки смените наконечник.

7.1.4 Для предотвращения контаминации всегда открывайте крышку только той пробирки, с которой идёт работа (внесение образца/реактива, удаление надосадочной жидкости), и закрывайте её после этого. Не допускается работать одновременно с несколькими пробирками с открытыми крышками.

7.1.5 Пробирки с исследуемыми образцами и отрицательным контрольным образцом (К-) необходимо обрабатывать по единой схеме одновременно.

7.2 Выделение ДНК

ВНИМАНИЕ! Выделение ДНК из крови проводится только набором реагентов в варианте исполнения ПРОБА-ОПТИМА МАКС (7.2.5). Выделение ДНК из остальных биологических материалов и культур микроорганизмов проводится набором реагентов в любом варианте исполнения (ПРОБА-ОПТИМА МАКС, ПРОБА-ОПТИМА).

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать лизирующий раствор (Фасовка N, ПРОБА-ОПТИМА) или новую пробирку с лизирующим раствором (Фасовка S, ПРОБА-ОПТИМА) или отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора реагентов (Фасовка N, ПРОБА-ОПТИМА МАКС).

7.2.1 Выделение ДНК из образцов, взятых в лизирующий раствор (мазки/соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, буккальный эпителий, биоптаты, культуры микроорганизмов)

7.2.1.1 Тщательно перемешайте содержимое пробирок с исследуемыми образцами и отрицательным контрольным образцом в течение 10-30 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.1.2 Осадите капли с крышек пробирок в течение 10-30 с на микроцентрифуге-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

вортексе.

7.2.1.3 Инкубируйте пробирки при температуре 90 °С в течение 20 минут.

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 «Гном» производства ООО «НПО ДНК–Технология»).

Рекомендуется использовать для термостата программу с активным финальным охлаждением пробирок или аккуратно извлечь пробирки из термостата и дать им остыть в вертикальном положении до комнатной температуры (от 18 °С до 25 °С).

7.2.1.4 Центрифугируйте пробирки при 16000 x g в течение 1 минуты.

ВНИМАНИЕ! Относительное ускорение центрифуги (RCF или g) зависит от частоты вращения и радиуса ротора. Для определения соответствия центрифуги заданным параметрам центрифугирования (см. раздел «Оборудование и материалы) обратитесь к руководству по эксплуатации.

7.2.1.5 Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР–амплификации. Полученный препарат ДНК допускается хранить при температуре от минус 20 °С до плюс 8 °С не более 7 суток.

7.2.1.6 Если образец предполагается использовать более 7 суток, перенесите с помощью дозатора в соответствующим образом промаркированную новую микроцентрифужную пробирку объёмом 1,5 мл необходимое количество препарата ДНК.

7.2.1.7 Перемешайте содержимое пробирки с нейтрализующим раствором в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе. Осадите капли с крышки в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.1.8 Добавьте в каждую пробирку, не касаясь края пробирки, необходимое количество нейтрализующего раствора, исходя из соотношения: 2,0 мкл нейтрализующего раствора на 100 мкл образца (см таблицу ниже).

Соотношение количества образца и нейтрализующего раствора.

	Образец, мкл						
	100	150	200	250	300	350	400
Нейтрализующий раствор, мкл	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2.1.9 Тщательно перемешайте содержимое пробирок в течение 10 с на микроцентрифуге-вортексе.

Полученный препарат ДНК допускается хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более месяца, от минус 18°С не более 6 месяцев.

7.2.1.10 Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР, необходимо разморозить его при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) или при температуре от 2 °С до 8 °С, перемешать содержимое пробирки в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугировать пробирку при 16000 x g в течение 1 минуты. Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР–амплификации.

ВНИМАНИЕ! Необходимо соблюдать правила взятия биологических образцов. При несоблюдении рекомендаций по взятию биологических образцов, транспортировке и их хранению, технологических нарушениях при выделении ДНК, попадании ингибирующих компонентов в пробирки, а также в случае если объём осадка составлял больше трети всего объёма образца в лизирующем растворе, эффективность ПЦР может снижаться вплоть до полного ингибирования реакции. В этом случае, возможно, потребуется провести дополнительную обработку образца (7.2.2, 7.2.3).

7.2.2 Выделение ДНК из образцов, взятых в лизирующий раствор или транспортную среду с нарушениями на преаналитическом этапе

7.2.2.1 Промаркируйте по одной новой пробирке с 400 мкл лизирующего раствора для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-».

7.2.2.2 Центрифугируйте исследуемые образцы с осадком более трети всего объёма или с ингибированием ПЦР при 16000 x g в течение 30-60 с.

7.2.2.3 После центрифугирования перенесите в соответствующие новые пробирки для исследуемых образцов по 100 мкл средней фракции надосадочной жидкости. В пробирку «К-» образец не вносится.

7.2.2.4 Повторите выделение ДНК, начиная с 7.2.1.2 -7.2.1.10.

7.2.3 Выделение ДНК из образцов, взятых в лизирующий раствор с нарушениями на преаналитическом этапе, с использованием других наборов реагентов для выделения ДНК.

При необходимости возможно проведение повторной обработки образцов с использованием других наборов реагентов, например, ПРОБА-ГС или ПРОБА-НК.

Для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2.3.1 Промаркируйте по одной новой одноразовой пустой пробирке для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-».

7.2.3.2 Центрифугируйте образцы с ингибированием ПЦР при 16000 x g в течение 30-60 с.

7.2.3.3 После центрифугирования перенесите в соответствующие новые пробирки 50-100 мкл средней фракции надосадочной жидкости согласно инструкции к используемому набору реагентов.

7.2.3.4 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», соответствующее количество отрицательного контрольного образца из используемого набора реагентов или стерильного физиологического раствора.

7.2.3.5 Проведите выделение ДНК соответственно инструкции к используемому набору реагентов.

7.2.4 Выделение ДНК из образцов, требующих предварительной подготовки.

7.2.4.1 Образцы, взятые в физиологический раствор (мазки/соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, культуры микроорганизмов), в транспортную среду СТОР-Ф, в том числе взятые в транспортные среды для цитометрии ThinPrep (Hologic, США).

7.2.4.1.1 Промаркируйте одноразовую пустую пробирку для отрицательного контрольного образца «К-», внесите в неё стерильный физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора реагентов, в объёме соответственно объёмам исследуемых образцов.

7.2.4.1.2 Центрифугируйте пробирки с исследуемыми образцами, взятыми в физиологический раствор или транспортную среду (рекомендуемый объём образца не более 500–600 мкл), и отрицательным контрольным образцом при 16000 x g в течение 10 минут. Если проводится пробоподготовка образца, взятого в транспортную среду для цитометрии ThinPrep, объём может быть увеличен до 1000 мкл.

7.2.4.1.3 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл или менее (осадок+жидкая фракция).

7.2.4.1.4 Добавьте по 400 мкл лизирующего раствора.

7.2.4.1.5 Проведите выделение ДНК, начиная с 7.2.1.2 -7.2.1.10.

7.2.4.2 Моча, амниотическая жидкость, ликвор

7.2.4.2.1 Промаркируйте по одной одноразовой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2.4.2.2 Перенесите в соответствующие пробирки по 1,0 мл исследуемого образца. В пробирку «К-» образцы не вносятся.

7.2.4.2.3 Внесите в пробирку «К-» 1,0 мл стерильного физиологического раствора или отрицательного контрольного образца.

7.2.4.2.4 Центрифугируйте все пробирки при 16000 x g в течение 10 минут.

7.2.4.2.5 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирках около 50 мкл или менее (осадок+жидкая фракция).

7.2.4.2.6 При наличии значительного количества осадка (более 50 мкл) добавьте в пробирки по 1,0 мл стерильного физиологического раствора, тщательно перемешайте содержимое в течение 10–30 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте пробирки при 16000 x g в течение 10 мин.

7.2.4.2.7 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл или менее (осадок+жидкая фракция).

7.2.4.2.8 Добавьте по 400 мкл лизирующего раствора.

7.2.4.2.9 Проведите выделение ДНК, начиная с 7.2.1.2 -7.2.1.10.

7.2.4.3 Эякулят

7.2.4.3.1 Промаркируйте по одной одноразовой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-».

7.2.4.3.2 Внесите в каждую пробирку по 1,0 мл стерильного физиологического раствора.

7.2.4.3.3 Перенесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 100 мкл эякулята. В пробирку «К-» эякулят не вносится.

7.2.4.3.4 Внесите в пробирку «К-» 100 мкл стерильного физиологического раствора или отрицательного контрольного образца.

7.2.4.3.5 Перемешайте содержимое пробирок в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.4.3.6 Центрифугируйте все пробирки при 16000 x g в течение 10 минут.

7.2.4.3.7 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирках примерно 50 мкл или менее (осадок+жидкая фракция).

7.2.4.3.8 При наличии значительного количества осадка (более 50 мкл) добавьте в пробирки по 1,0 мл стерильного физиологического раствора, тщательно перемешайте содержимое в течение 10–30 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте пробирки при 16000 x g в течение 10 мин.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2.4.3.9 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл или менее (осадок+жидкая фракция).

7.2.4.3.10 Добавьте по 400 мкл лизирующего раствора.

7.2.4.3.11 Проведите выделение ДНК, начиная с 7.2.1.2 -7.2.1.10.

7.2.4.4 Фекалии

7.2.4.4.1 Промаркируйте по одной одноразовой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-».

7.2.4.4.2 Внесите в каждую пробирку по 1,0 мл стерильного физиологического раствора.

7.2.4.4.3 Перенесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов фекалии размером с горошину диаметром около 0,5 см. В пробирку «К-» фекалии не вносятся.

7.2.4.4.4 Тщательно перемешайте содержимое пробирок в течение 10–30 секунд на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте пробирки при 900 x g в течение 15 мин.

7.2.4.4.5 Промаркируйте по одной пробирке объёмом 1,5 мл с 400 мкл лизирующего раствора для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-».

7.2.4.4.6 Перенесите в соответствующие пробирки по 50 мкл средней фракции надосадочной жидкости.

7.2.4.4.7 Добавьте по 400 мкл лизирующего раствора.

7.2.4.4.8 Проведите выделение ДНК, начиная с 7.2.1.2 -7.2.1.10.

ВНИМАНИЕ! Выделение ДНК из фекалий по данной методике не рекомендуется для изучения состава микробиоты толстого кишечника.

7.2.4.5 Молоко

7.2.4.5.1 Промаркируйте по одной одноразовой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-».

7.2.4.5.2 Перенесите в соответствующие пробирки по 1,0 мл исследуемого образца. В пробирку «К-» образцы не вносятся.

7.2.4.5.3 Внесите в пробирку «К-» 1,0 мл стерильного физиологического раствора или отрицательного контрольного образца.

7.2.4.5.4 Перемешайте содержимое пробирок в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2.4.5.5 Центрифугируйте все пробирки при 16000 x g в течение 10 минут.

7.2.4.5.6 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирках примерно 50 мкл или менее (осадок+жидкая фракция).

7.2.4.5.7 Добавьте к осадку 400 мкл лизирующего раствора, ресуспендируйте осадок при помощи пипетирования, не захватывая верхний слой молочного жира, остающийся на стенках пробирки.

7.2.4.5.8 Промаркируйте по одной новой одноразовой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого исследуемого образца.

7.2.4.5.9 Перенесите в соответствующие пробирки всю суспензию, не захватывая верхний слой молочного жира, остающийся на стенке.

7.2.4.5.10 Добавьте в пробирку «К-» 400 мкл лизирующего раствора.

7.2.4.5.11 Проведите выделение ДНК, начиная с 7.2.1.2 -7.2.1.10.

7.2.5 Выделение ДНК из крови (только с использованием набора реагентов ПРОБА-ОПТИМА МАКС)

7.2.5.1 Промаркируйте по одной новой одноразовой пробирке для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-».

7.2.5.2 Внесите в соответствующие пробирки по 100 мкл крови при выделении ДНК человека для последующего исследования генетических полиморфизмов или по 100–500 мкл крови при выделении ДНК микроорганизмов. При выделении ДНК микроорганизмов рекомендуется использовать 500 мкл крови, так как при наличии в образце микроорганизмов увеличение объёма крови для исследования приводит к возрастанию концентрации их ДНК в конечном препарате. В пробирку «К-» кровь не вносится.

7.2.5.3 Внесите в пробирку «К-» отрицательный контрольный образец в объёме, равном объёму крови в пробирках для исследуемых образцов.

7.2.5.4 Добавьте во все пробирки промывочный раствор СК в объёме, равном объёму крови/отрицательного контрольного образца.

7.2.5.5 Тщательно перемешайте содержимое пробирок в течение 10-30 с на микроцентрифуге-вортексе до его равномерного окрашивания. В пробирке «К-» содержимое остаётся бесцветным.

7.2.5.6 Инкубируйте пробирки в вертикальном положении при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 5 мин. За время инкубации перемешайте содержимое пробирок 2-3 раза в течение 20-30 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.5.7 Центрифугируйте все пробирки при 16000 x g в течение 10 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВНИМАНИЕ! Относительное ускорение центрифуги (RCF или g) зависит от частоты вращения и радиуса ротора. Для определения соответствия центрифуги заданным параметрам центрифугирования (см. раздел «Оборудование и материалы») обратитесь к руководству по эксплуатации.

7.2.5.8 Удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки), не задевая расположенный в конусной части пробирки рыхлый пристеночный сгусток, оставив в пробирках примерно 10-20 мкл (осадок+жидкая фракция).

ВНИМАНИЕ! Сгусток может неплотно держаться на стенке пробирки.

7.2.5.9 Добавьте в каждую пробирку по 1400 мкл промывочного раствора Р.

7.2.5.10 Тщательно перемешайте содержимое пробирок в течение 20-30 с на микроцентрифуге-вортексе, стараясь разбить осадок при его наличии.

7.2.5.11 Центрифугируйте пробирки при 16000 x g в течение 5 минут.

7.2.5.12 Удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки), не задевая расположенный в конусной части пробирки рыхлый пристеночный сгусток, оставив в пробирках примерно 10 мкл (осадок+жидкая фракция).

ВНИМАНИЕ! Сгусток может неплотно держаться на стенке пробирки.

7.2.5.13 Добавьте в пробирки по 100 мкл лизирующего раствора при выделении ДНК микроорганизмов или по 300 мкл лизирующего раствора при выделении ДНК человека для последующего исследования генетических полиморфизмов.

7.2.5.14 Тщательно перемешайте содержимое пробирок в течение 10–30 с на микроцентрифуге-вортексе, стараясь разбить осадок.

7.2.5.15 Осадите капли с крышек пробирок в течение 10–30 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.5.16 Инкубируйте пробирки при температуре 90 °С в течение 20 минут.

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 «Гном» производства ООО «НПО ДНК–Технология»). Рекомендуется использовать для термостата программу с активным финальным охлаждением пробирок или аккуратно извлечь пробирки из термостата и дать им остыть в вертикальном положении до комнатной температуры (от 18 °С до 25 °С).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2.5.17 Центрифугируйте пробирки при 16000 x g в течение 1 минуты.

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР–амплификации. Полученный препарат ДНК допускается хранить при температуре от минус 20 °С до 8°С не более 7 суток.

7.2.5.18 Если образец предполагается использовать более 7 суток, перемешайте содержимое пробирки с нейтрализующим раствором в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе. Осадите капли с крышки в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.5.19 Добавьте в каждую пробирку, не касаясь края пробирки, необходимое количество нейтрализующего раствора, исходя из соотношения: 2,0 мкл нейтрализующего раствора на 100 мкл образца или 6,0 мкл нейтрализующего раствора на 300 мкл образца.

7.2.5.20 Тщательно перемешайте содержимое пробирок в течение 10 с на микроцентрифуге-вортексе.

Полученный препарат ДНК допускается хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более месяца, от минус 18°С не более 6 месяцев.

Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР необходимо разморозить его при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) или при температуре от 2 °С до 8 °С, перемешать содержимое пробирки в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугировать пробирку при 16000 x g в течение 1 минуты.

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР–амплификации.

8 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

8.1 Транспортирование

8.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов, в течение всего срока годности.

8.1.2 Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами при температуре внутри контейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

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

8.2 Хранение

8.2.1 Набор реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

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

8.3 Указания по эксплуатации

8.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

8.3.2 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

8.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

8.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат

9 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

9.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

9.2 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.

10 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

10.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

10.2 Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

11 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

12 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон	REF	Каталожный номер
	Количество тестов		Адрес изготовителя
	Годен до		Не стерильно
LOT	Серия набора реагентов		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Дата изготовления		

13 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ Р 2.105-2019 Единая система конструкторской документации. Общие требования к текстовым документам.

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

ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство (СРПП). Медицинские изделия.

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

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.

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

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

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

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.

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

Примечание – Указанные выше стандарты являлись 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

14 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-ОПТИМА, 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, www.dna-technology.ru

Старший научный сотрудник
ООО «НПФ ДНК-Технология» к.б.н. Л.В. Артемова
«13» 05 2022г.

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ «НМИЦ АГП
им. В.И. Кулакова» Минздрава России
академик РАН, профессор Г.Т. Сухих
05 2022 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru