Организация-производитель

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор
ООО «ДНК-Технология ТС»

С.А. Самарин

2022 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «НПФ ДНК-Технология»

С.П. Левичев

2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения полиморфизма -13910 T>C в гене MCM6, ассоциированного с непереносимостью лактозы, методом ПЦР в режиме реального времени

(Генетика метаболизма лактозы)

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

2022

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

ИВ	- интерферирующие вещества
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ВК	- внутренний контроль
КО	- контрольные образцы
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 определения полиморфизма -13910 T>C в гене MCM6, ассоциированного с непереносимостью лактозы, методом ПЦР в режиме реального времени (Генетика метаболизма лактозы), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 **Назначение:** Набор реагентов предназначен для определения полиморфизма -13910 T>C в гене MCM6, ассоциированного с непереносимостью лактозы, методом ПЦР в режиме реального времени в биологическом материале человека (цельная периферическая кровь, сухие пятна крови, буккальный эпителий).

1.3 **Функциональное назначение:** диагностика *in vitro*, скрининг.

1.4 **Показания к проведению исследования:** диагностирование или прогнозирование возникновения лактазной недостаточности, связанной с полиморфизмами гена MCM6. Противопоказаний к применению нет.

1.5 **Демографические и популяционные аспекты:** применение медицинского изделия не зависит от популяционных и демографических аспектов.

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

1.7 **Потенциальные пользователи:** квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

1.8 Применять набор 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 нераскапанной фасовке (маркируется – Фасовка N) в следующих комплектациях:

REF R1-H962-N3/4, Комплектация №1			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации: – MCM6: -13910 T>C	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	960 мкл
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	1,0 мл
REF R1-H963-N3/4, Комплектация №2			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации: – MCM6: -13910 T>C	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	960 мкл
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Контрольный образец (частая гомозигота)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	60 мкл
Контрольный образец (редкая гомозигота)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	60 мкл

2.2 Число анализируемых проб

Набор реагентов предназначен для однократного применения и рассчитан на проведение 48 определений.

2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени, анализ кривых плавления, качественный анализ.

В основе работы набора реагентов лежит принцип амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров комплементарных специфическому участку ДНК и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

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

В смесь для амплификации введены сигнальные зонды, содержащие флуоресцентные метки Fam и Hex, на каждый вариант определяемого генетического полиморфизма. После окончания ПЦР проводится раунд температурного плавления дуплексов, образованных ампликонами и сигнальными зондами, в результате чего изменяется уровень флуоресценции, который фиксируется и представляется программным обеспечением прибора в виде графика. Если сигнальный зонд частично комплементарен ДНК-мишени, температура плавления такого дуплекса будет ниже температуры плавления дуплекса в случае полной комплементарности зонда. На основании температуры плавления сигнальных зондов проводится интерпретация результатов анализа.

В состав смесей для амплификации, специфичных для каждого генетического полиморфизма, включена система для амплификации фрагмента геномной ДНК человека – внутренний контроль (ВК), который позволяет контролировать количество ДНК в амплификационной пробирке и исключить ошибки генотипирования.

Система для амплификации геномной ДНК человека включает ДНК-зонд, который содержит флуоресцентную метку (Cy5) и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) возрастает пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

Набор реагентов Генетика метаболизма лактозы включает смесь для амплификации, специфичную для генетического полиморфизма MCM6: -13910 T>C. Перечень возможных генотипов, определяемых набором, приведен в таблице 1.

Таблица 1 – Перечень возможных генотипов, определяемых набором реагентов Генетика метаболизма лактозы

Полиморфизм	Генотип		
	Частая гомозигота	Редкая гомозигота	Гетерозигота
MCM6: -13910 T>C	CC	TT	CT

Использование трёх флуоресцентных красителей позволяет одновременно определять два аллеля и оценивать наличие геномной ДНК в одной пробирке.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать

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

результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке. В таблице 2 представлены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 2 – Каналы детекции продуктов амплификации

Полиморфизм (наименование смеси для амплификации)	Каналы детекции аллельных вариантов и внутреннего контроля[1]				
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
MCM6: -13910 T>C	C	T	-	ВК	-

[1]Система внутреннего контроля (ВК), представляет собой систему амплификации геномной ДНК человека, позволяет оценить наличие ДНК в амплификационной пробирке и исключить ошибки генотипирования.

Исследование с использованием набора реагентов состоит из этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация в режиме реального времени.

Для проведения ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени используют детектирующие амплификаторы (ООО «НПО ДНК-Технология»): ДТлайт[1], ДТпрайм[2] или ДТ-96.

Для контроля определения частой и редкой гомозигот при проведении исследования используют контрольные образцы к набору реагентов Генетика метаболизма лактозы.

Контрольные образцы представляют собой клонированные участки гена MCM6 находящиеся в частом или редком гомозиготных состояниях, которые предназначены для контроля качества исследования (определения частой и редкой гомозигот) конечным пользователем набора. Контрольные образцы совместимы только с набором реагентов Генетика метаболизма лактозы.

Таблица 3 – Контрольные образцы к набору Генетика метаболизма лактозы

Контрольный образец	Контролируемая смесь для амплификации	Ожидаемый результат генотипирования
Частая гомозигота	MCM6: -13910 T>C	CC
Редкая гомозигота	MCM6: -13910 T>C	TT

2.4 Время проведения анализа (без учета пробоподготовки): от 2,5 часов.

[1] только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2.

[2] только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6.

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения – не менее 1,0 нг ДНК человека на амплификационную пробирку, что соответствует 300 копий ДНК (Ср≤32,0 на канале детекции ВК (Cy5)). При использовании меньшего количества ДНК (Ср >32,0 на канале детекции ВК) производитель не гарантирует корректную работу набора.

В образцах с недостаточным количеством ДНК (менее 1,0 нг на амплификационную пробирку) после завершения реакции амплификации регистрируется недостоверный результат.

3.2 Аналитическая специфичность

Интерферирующие вещества (ИВ) в концентрациях: гемоглобин – 0,35 мг/мл образца ДНК, изопропиловый спирт – 100 мкл/мл образца ДНК, метилацетат – 100 мкл/мл образца ДНК не влияют на специфичность набора реагентов.

3.3 Диагностические характеристики

Диагностическая чувствительность - 100% (93,73-100);
Диагностическая специфичность - 100% (97,62-100).

3.4 Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость

Внутрисерийная воспроизводимость составляет 100% (95% доверительный интервал 83,16–100%).

Межсерийная воспроизводимость составляет 100% (95% доверительный интервал 83,16–100%).

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

4 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 и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором 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 и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

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.

Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

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.

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

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

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

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

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

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	Генетика метаболизма лактозы
Смеси для амплификации (4 наименования)	Нет опасных веществ
Полимераза ТехноТаq МАХ	Нет опасных веществ
ПЦР-буфер	Нет опасных веществ
Минеральное масло	Нет опасных веществ
Контрольный образец (частая гомозигота)	**Азид натрия менее 0,1%**
Контрольный образец (редкая гомозигота)	**Азид натрия менее 0,1%**

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности, контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не 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 Генетика метаболизма лактозы требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий (ДТлайт[3] (РУ № ФСР 2011/10228), ДТпрайм[4] (РУ № ФСР 2011/10229) или ДТ-96 (РУ № ФСР 2007/01250) (производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник с морозильной камерой;
- пробирки, объёмом 1,5 мл с крышками;
- пробирки амплификационные одноразовые, объёмом 0,2 мл с крышками или пробирки амплификационные, объёмом 0,2 мл, стрипованные по 8 шт., с крышками (стрипы);
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,5 до 10,0 мкл, от 2,0 до 20 мкл, от 10 до 100 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл, от 200 до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники для полуавтоматических дозаторов, свободные от ДНКаз и РНКаз, объёмом 20 мкл с фильтром, 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- набор/комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА (РУ № ФСР 2010/08696), ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА (РУ № ФСР 2010/08695) (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), ПРОБА-ЦИТО СП (РУ № РЗН 2021/14367), ПРОБА-МЧ-МАКС (РУ № РЗН 2021/14391), ПРОБА-ОПТИМА*, ПРОБА-ОПТИМА МАКС* (после получения регистрационного удостоверения) (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия)).

---

[3] только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2.

[4] только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6.

*Наборы реагентов находятся на этапе регистрации и валидированы на этапе клинических испытаний

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

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь, сухие пятна крови и буккальный эпителий.

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

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкциями к комплектам/наборам реагентов для выделения ДНК из соответствующего биологического материала.

6.1.1 Взятие цельной периферической крови

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. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2-3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.1.2 Получение сухих пятен крови

Кровь наносится на бумажный носитель в количестве, достаточном для получения пятна диаметром не менее 1 см, при этом кровь должна пропитать бумагу насквозь. В качестве носителя (тест-бланка) используют специальные медицинские изделия, имеющие регистрационные удостоверения и предназначенные для соответствующего вида биоматериала. В ходе клинических испытаний производителем было валидировано следующее медицинское изделие: Карта для забора и транспортировки биологического материала по ТУ 9398-001-63802255-2016, ООО «Гринвэн», Россия (РУ № РЗН 2017/6431).

После нанесения образца, тест-бланк высушивается в горизонтальном положении на чистой обезжиренной поверхности не менее 2 часов без применения дополнительной тепловой обработки и попадания прямых солнечных лучей.

ВНИМАНИЕ! Во избежание получения неверных результатов нельзя допускать, чтобы кто-либо, кроме исследуемого пациента, прикасался к бумажному бланку без перчаток.

Из центральной части сухого пятна специальным пробойником выбить 3 диска диаметром 3 мм и поместить в микропробирку объемом 1,5 мл.

ВНИМАНИЕ! Рекомендуется выбивать диски непосредственно перед процедурой выделения ДНК.

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

6.1.3 Взятие буккального эпителия

ВНИМАНИЕ: Взятие клинического материала осуществляется сухим зондом! Необходимо **исключить** контакт растворов с кожей, глазами и слизистыми оболочками.

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. Поместить стерильный зонд в ротовую полость и тщательно потереть внутреннюю поверхность щеки в направлении от шеи к губам и обратно. Движение осуществлять с нажимом в течение 60 секунд. После взятия клинического материала перенесите зонд в пробирку объёмом 1,5 мл, содержащую транспортную среду или лизирующий раствор. Затем извлеките зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, отожмите избыток жидкости, удалите зонд и выбросьте. Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте.

6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала

Допускается транспортирование и хранение образцов:

Цельная периферическая кровь - при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре минус 20 °С в течение одного месяца.

Сухие пятна крови – допустимо до года после просушивания в индивидуальных упаковках в условиях низкой влажности (не более 30%) при температуре от 2 °С до 8 °С. При более длительных сроках хранения образцы сухих пятен крови следует хранить как рекомендует производитель тест-бланков.

Буккальный эпителий - при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре минус 20 °С в течение одного месяца.

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

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов, имеющие регистрационные удостоверения медицинского изделия и предназначенные для соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования ДНК методом ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК из биологического материала одновременно необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор, в объёме, указанном в инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК из биологического материала одновременно необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор, в объёме, указанном в инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.

7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

7.2.1 Промаркируйте необходимое количество пробирок для амплификации объёмом 0,2 мл (по одной для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца и для каждого контрольного образца при необходимости).

Пример: необходимо проанализировать пять образцов. При использовании набора реагентов в комплектации №1 нужно промаркировать 6 пробирок – 5 для исследуемых образцов, одну для отрицательного контрольного образца. При использовании набора реагентов в комплектации №2 нужно промаркировать 8 пробирок – 5 для исследуемых образцов, одну для отрицательного контрольного образца, две для контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий избегать воздействия солнечных лучей на пробирки со смесями для амплификации.

7.2.2 Встряхните пробирки со смесями для амплификации в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Внесите в промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации (для каждого полиморфизма отдельным наконечником).

7.2.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаq MAX в течение 3-5 с

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

и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq МАХ доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq МАХ. Смешайте в отдельной пробирке:

- 10 х (N+1) мкл ПЦР-буфера;
- 0,5 х (N+1) мкл полимеразы ТехноТаq МАХ,

где N – количество промаркированных пробирок с учётом пробирки для К- и контрольных образцов (при необходимости).

Пример: необходимо проанализировать 5 образцов с использованием набора реагентов в комплектации №2. Промаркированных пробирок – 8. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ для 9 (8+1) пробирок, т.е. 90 мкл ПЦР-буфера необходимо смешать с 4,5 мкл полимеразы ТехноТаq МАХ.

7.2.6 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием, хранение смеси не допускается.

7.2.7 Добавьте в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq МАХ.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ в пробирки со смесями для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить пп. 7.2.8 – 7.2.13.

7.2.8 Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.

7.2.9 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, контрольными образцами (КО) и отрицательным контрольным образцом (К-) в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-МАКС необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
2. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки

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

только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.10 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК (кроме пробирок для КО и К-).

7.2.11 Внесите в пробирки, промаркированные «К-», по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (п.7.1).

7.2.12 При использовании набора реагентов в комплектации №2: внесите в пробирки, промаркированные «КО», по 5,0 мкл соответствующего контрольного образца.

7.2.13 Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.2.14 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора. Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.

7.2.15 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR, в режиме «Работа с прибором». Загрузите файл «Lactose.ini». Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.2.14) и проведите ПЦР.

7.2.16 При выборе теста в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 4.

Примечание – Тип пробирки для отрицательных контрольных образцов (К-) и контрольных образцов (КО) к набору следует указывать как «Образец».

ВНИМАНИЕ! Расположение пробирок на матрице термоблока должно строго соответствовать порядку установки пробирок в блоке.

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Δt, °С	Тип блока
1	80	2	00	1			Цикл
	94	5	00				
2	94	0	30	5			Цикл
	67	0	15		√		
3	94	0	5	45			Цикл
	67	0	15		√		
4	25	0	30	1			Цикл
5*	25	0	15	50	√	1,0	«Кривая плавления», Δt=1 °С; $T_{кон}$=75 °С
6	10	…	…	хранение			хранение

* При создании блока 5 отметить тип "Кривая плавления"

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

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация результатов ПЦР осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.

8.2 На графике будет отображена зависимость флуоресценции от температуры плавления для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, название выявляемого полиморфизма и результат генотипирования каждого образца. По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчет.

8.3 В бланке ответа указываются генотипы образца с краткой характеристикой и заключением по результатам генотипирования.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.

9.2 Для всех образцов программа фиксирует результат амплификации геномной ДНК человека (ВК). Для корректной работы набора реагентов количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку, что соответствует $Cp \leq 32{,}0$.

9.3 В образцах, прошедших ПЦР, и содержащих достаточное для корректного анализа количество ДНК, программа определяет генотип исследуемого образца, который отображён в таблице в графе «Полиморфизм».

9.4 В контрольных образцах (КО) к набору должен быть определён соответствующий генотип (см. таблицу 3), который отображён в таблице в графе «Полиморфизм».

9.5 Для образцов с недостаточным для анализа количеством ДНК (менее 1,0 нг на пробирку, $Cp > 32{,}0$ на канале детекции ВК), программа определяет недостоверный результат: 

В случае получения недостоверного результата требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

9.6 Для образцов с достаточным для анализа количеством ДНК ($Cp \leq 32{,}0$) программа может определять сомнительный результат (

) согласно следующим параметрам анализа полиморфизмов:

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

- «Анализ по температурным пикам» – температура плавления продуктов ПЦР отличается от заданной более, чем на 3,0 °С;
- «Разностный анализ» – разница между заданной и полученной температурами плавления по каналам Fam и Hex в пределах одного генотипа составляет более 2,0 °С;
- «Нижний порог температурного пика» – температурный пик (dF/dT) < 5,0.

Для таких образцов требуется повторное проведение ПЦР.

9.7 Для отрицательных контрольных образцов программа фиксирует недостоверный результат: | нд | нд |

9.8 При получении положительного значения (определение генотипа) в отрицательном контрольном образце результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

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

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

10.1.2 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТаq МАХ, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТаq МАХ в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера до 25 °С не более 5 суток.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Все компоненты набора, за исключением полимеразы ТехноТаq МАХ, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.

10.2.2 Полимеразу ТехноТаq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности.

10.2.3 Смесь для амплификации следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности.

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

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.3.2 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора, за исключением полимеразы ТехноТаq МАХ, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности;
- полимеразу ТехноТаq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности;

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

– смесь для амплификации следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности;

10.3.3 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 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.

11.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

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

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

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

14 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		Нестерильно
LOT	Серия набора		Не допускается воздействия солнечного света
	Дата изготовления		

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

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-2019 Единая система конструкторской документации (ЕСКД). Общие требования к текстовым документам.

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

ГОСТ Р 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики 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 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований, Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

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. Ч.1. Основные требования.

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

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

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

16 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 медицинской 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», Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 4.

Место производства:

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов Генетика метаболизма лактозы, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:

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

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

E-mail: hotline@dna-technology.ru

www.dna-technology.ru

Заместитель генерального директора»
по науке ООО «НПФ ДНК-Технология»
к.б.н.

Абрамов
Д.Д. Абрамов
«27» 04 2022 г.

СОГЛАСОВАНО
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

П.К. Варнавичус
«27» 04 2022 г.

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