ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

Инструкция по применению
ПРОБА-НК-ФЕТ

Организация-производитель

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «ДНК-Технология ТС»

_____ С.П. Левичев

«__» _____ 2016 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НПФ ДНК-Технология»

_____ Д.Ю. Трофимов

«__» _____ 2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Комплект реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери

ПРОБА-НК-ФЕТ

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

2016 г.

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

ВВЕДЕНИЕ

Неинвазивная пренатальная молекулярно-генетическая диагностика

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

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

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Настоящая инструкция распространяется на комплект реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери ПРОБА-НК-ФЕТ.

1.2 Комплект реагентов предназначен для выделения фетальной ДНК (ДНК плода) из крови матери.

1.3 Комплект может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 Состав комплекта реагентов

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

2.2 Число анализируемых проб

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

2.3 Принцип метода

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

2.4 Время проведения выделения ДНК: от 2 ч.

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

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические ПЦР исследования клинического материала с соблюдением 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», и с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

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

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

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

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

При использовании комплекта реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

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

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

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

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

При работе с комплектом реагентов необходимо использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не использовать комплект реагентов:

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

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

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

- центрифуга для пробирок объёмом 4,5 мл, с RCF не ниже 1150 g, например, центрифуга EBA 20 Hettich (3461 g или 6000 об/мин);
- центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF не ниже 17000 g, например, центрифуга HERAEUS pico17 (17000 g или 13300 об/мин);
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 65 °С до 98 °С;
- микроцентрифуга-вортекс, например BioSan, Латвия или аналогичная;

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

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

- холодильник бытовой с морозильной камерой Стинол, Россия или аналогичный;
- насос с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;
- контейнер для замораживания, например, штатив IsoFreeze 24x1,5/2 мл, SSI, или штатив CoolRack M15, 15x1,5/2 мл, Biocision, или другое аналогичное оборудование;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл, например SSI, США ;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости 2–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл например Eppendorf, Германия или аналогичные;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл, например Axygen, США или аналогичные;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

5 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

5.1 Материал для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

Взятие цельной периферической крови

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

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

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

5.2 Транспортировка и хранение исследуемого материала

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

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

5.3 Получение плазмы крови

Центрифугируйте пробирки с кровью при 2000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

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

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

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

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

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

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6.6 Поместите пробирки в охлаждающий штатив на 10 мин.

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

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

6.7 Осушите пробирки бумажной салфеткой. Центрифугируйте пробирки при 13300 об/мин в течение 25 мин при комнатной температуре.

6.8 Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-» по новой пластиковой пробирке объёмом 1,5 мл.

6.9 Отберите по 300 мкл супернатанта (из пробирки, маркированной «К-», 300 мкл раствора) и перенесите в соответствующие промаркированные пробирки.

ВНИМАНИЕ! Если объём супернатанта менее 300, но более 100 мкл, отберите и перенесите весь объём. Если объём супернатанта менее 100 мкл, то, возможно, предыдущие этапы выделения фетДНК проведены некорректно (неправильные условия хранения крови или плазмы, несоответствие скоростных и временных условий центрифугирования образцов, несоблюдение температурных режимов). В этом случае необходимо провести повторное выделение фетДНК из дополнительной пробирки с плазмой или повторное взятие крови у пациентки.

6.10 Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки. Закройте крышки пробирок.

6.11 Встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с, осадите капли центрифугированием на вортексе в течение 30 с.

6.12 Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 15 мин, осадите конденсат центрифугированием на вортексе в течение 30 с.

6.13 Добавьте в каждую пробирку по 600 мкл реагента для преципитации, встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

ВНИМАНИЕ! После добавления реагента для преципитации, пробирки необходимо выдержать в горизонтальном положении в течение 7-10 мин, однократно встряхнув на микроцентрифуге-вортексе в течение этого времени.

6.14 Центрифугируйте пробирки при 13300 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре.

6.15 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

6.16 Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора № 1 и перемешайте на вортексе в течение 3-5 с.

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

6.17 Центрифугируйте пробирки при 13300 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

6.18 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

6.19 Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора № 2 и перемешайте на вортексе в течение 3-5 с.

6.20 Центрифугируйте пробирки при 13300 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

6.21 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

6.22 Откройте крышки пробирок и высушите осадок при температуре 65 °С в течение 1 мин.

6.23 Добавьте к осадку 35 мкл буфера для растворения, закройте крышки и прогрейте пробирки при температуре 65 °С в течение 10 мин. Перемешайте на вортексе в течение 3-5 с.

6.24 Осадите капли центрифугированием пробирок при 13300 об/мин в течение 30 сек при комнатной температуре.

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

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

7 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

7.1 Транспортирование

7.1.1 Транспортирование комплекта осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов, входящих в состав комплекта.

7.1.2 Комплекты реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

7.2 Хранение

7.2.1 Комплект реагентов следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

7.2.2 Комплекты реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

7.3 Указания по эксплуатации

7.3.1 Комплект реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

7.3.2 После вскрытия упаковки компоненты комплекта следует хранить при следующих условиях:

- компоненты комплекта следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

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

8 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

8.1 Комплекты, пришедшие в непригодность, в том числе, в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790 и МУ 1.3.2569.

8.2 Компоненты комплекта реагентов с наличием предупредительных знаков об опасности следует уничтожать с соблюдением соответствующих мер безопасности в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации.

8.3 Жидкие компоненты, входящие в состав комплекта реагентов пришедшие в непригодность перед сливом в канализацию должны быть предварительно разбавлены водой 1:100.

8.4 Непригодные для использования комплекты реагентов, упаковка комплектов реагентов (пробирки, флаконы, полиэтиленовые пакеты с замком и коробки из картона) относятся к отходам класса А и утилизируются с бытовыми отходами.

9 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

9.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие комплекта реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

9.2 Срок годности комплекта – 12 месяцев со дня приёмки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

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

Символы, используемые при маркировке комплекта реагентов

	Только для in vitro диагностики
	Температурный диапазон
	Количество определений
	Годен до
	Серия комплекта
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Не допускается воздействие солнечного света

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

Символы и обозначения опасности при маркировке комплекта реагентов

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

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов ПРОБА-НК-ФЕТ, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, к.6. тел./факс +7 (495) 980-45-55, +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки: 8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный),

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/customer_support/

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

Ведущий научный сотрудник
ООО «НПФ ДНК-Технология», Кириллов М.Ю.

«07» 11 2016 г.

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ «НЦАГиП
им. В.И. Кулакова» Минздрава России,
академик РАН, профессор Г.Т. Сухих

«11» 11 2016 г.

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