ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

U

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК

HLA-ДНК-ТЕХ

Комплект реагентов для типирования гена DQA1

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/03891 от 10 мая 2017 года

Фасовка:
универсальная (U)

Каталожный номер:
R1-H002-N3/5 (24 определения)

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

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

ВВЕДЕНИЕ

Система генов тканевой совместимости человека (HLA) является одной из наиболее полиморфных генетических систем, выполняющей в организме человека ряд функций. Обеспечивая регуляцию иммунного ответа, система HLA осуществляет генетический контроль взаимодействия всех иммунокомпетентных клеток организма, распознавание своих и чужеродных (в том числе измененных собственных) клеток, запуск и реализацию иммунного ответа и, в целом, обеспечивает выживание человека как вида в условиях экзогенной и эндогенной агрессии. Многообразие указанных функций обеспечивается особенностями строения главного комплекса гистосовместимости. Одна из этих особенностей – выраженный аллельный полиморфизм комплекса генов HLA.

Комплекс генов HLA компактно расположен на коротком плече 6 аутосомной хромосомы и занимает 3500 килобаз (kb). В состав HLA входит три группы генов, кодирующие, соответственно, три группы белковых продуктов (молекул). Молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса (A, B, C) присутствуют на поверхности всех типов клеток, кроме эритроцитов и клеток трофобласта, они участвуют в процессе презентации пептидов мутантных, трансформированных и инфицированных вирусом клеток собственного организма, и соответственно дальнейшей элиминации таких клеток. Молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса (DP, DM, DQ, DR) участвуют в процессе презентации чужеродных пептидов, например бактериальных, и соответственно в процессе развития иммунного ответа. Такие молекулы экспрессируются лишь немногими типами клеток, выполняющими функции антигенпредставляющих клеток (АПК), а именно В-лимфоцитами, активированными Т-клетками, макрофагами, дендритными клетками и клетками Лангерганса. Молекулы главного комплекса гистосовместимости III класса являются компонентами системы комплемента и других белков, присутствующих в крови.

Научное обоснование

Ген HLA-DQA1 относится к генам гистосовместимости человека (HLA) II класса, обладает выраженным полиморфизмом. Известно более 70 аллелей данного гена (8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601)). Генотипирование по локусу DQA1 на уровне

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

групп аллелей (low resolution, низкое разрешение) достаточно для большинства приложений результатов генотипирования, в частности используется для подбора тканесовместимых донора и реципиента при первичных трансплантациях органов, например почек. Показано, что такой уровень генотипирования является достаточным и соответствует стандартам передовых трансплантологических центров мира.

Медицинское обоснование

Трансплантация органов и тканей. Генотипирование по локусам DRB1, DQA1 и DQB1 на уровне групп аллелей используется для подбора тканесовместимых донора и реципиента при первичных трансплантациях органов, для подбора потенциального донора при родственных пересадках гемопоэтических стволовых клеток, а также для первичного скрининга потенциального донора при неродственных пересадках гемопоэтических стволовых клеток.

Репродуктивные проблемы. Различие супругов по вариантам генов HLA является одним из важных условий успешного наступления и вынашивания беременности. Сходство супругов между собой по вариантам HLA ведёт к увеличению вероятности появления зародыша с двойным набором одинаковых вариантов генов, то есть HLA-гомозигот, что является неблагоприятным фактором, следствием чего могут быть репродуктивные потери. Поэтому для диагностики причин репродуктивных неудач используют HLA-типирование супругов, чтобы установить сходство между ними по вариантам генов HLA.

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

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов для типирования гена DQA1

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов HLA-ДНК-ТЕХ предназначен для определения специфичностей главного комплекса тканевой совместимости человека на уровне генов методом полимеразной цепной реакции в биологическом материале человека (периферическая кровь) с использованием детектирующих амплификаторов.

Полученные результаты могут быть использованы для подбора гистосовместимого донора при трансплантации органов и тканей, для генетического прогнозирования иммуноопосредованных заболеваний и нарушений репродукции

1.2 Комплект реагентов для типирования гена DQA1 предназначен для одновременного определения 8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601) главного комплекса тканевой совместимости человека.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 Принцип действия

Исследования проводятся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В основе работы комплекта 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 достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

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

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку 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) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

В некоторые смеси для амплификации введены сигнальные зонды, содержащие флуоресцентные метки Fam и Hex. 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 совокупных данных о пороговых циклах амплификации и температуры плавления сигнальных зондов проводится интерпретация результатов анализа.

Комплект реагентов для типирования гена DQA1 включает смеси для амплификации, специфичные для 8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601), в состав которых в том числе входит внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции специфичностей гена DQA1, включены флуоресцентные метки Fam, Hex и Rox. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации внутреннего контрольного образца (ВК), входит флуоресцентный краситель Cy5 (таблица 1). Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет

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

сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Таблица 1 - Каналы детекции продуктов амплификации

Название смеси для амплификации	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
DQA1-1	0301	0501	0201	ВК	-
DQA1-2	-	-	0401, 0601	ВК	-
DQA1-3	-	-	0101, 0102, 0103	ВК	-
DQA1-4	-	-	0103, 0102, 0101	ВК	-

Для контроля качества проведения исследования используют контрольные образцы «K+ DQ FAM» и «K+ DQ HEX», представляющие собой смеси клонированных участков генов HLA-DQA1 и HLA-DQB1, выявляемых с применением комплекта.

Исследование с использованием комплекта реагентов для типирования гена DQA1 состоит из этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация в режиме реального времени.

2.2 Комплект реагентов рассчитан на 24 определения, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Состав комплекта

Комплект реагентов для типирования гена DQA1 выпускается в универсальной фасовке (маркируется – фасовка U) и включает следующие компоненты:

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

- Смеси для амплификации:
  - DQA1-1 – 1 пробирка (480 мкл);
  - DQA1-2 – 1 пробирка (480 мкл);
  - DQA1-3 – 1 пробирка (480 мкл);
  - DQA1-4 – 1 пробирка (480 мкл);
- ПЦР-буфер – 2 пробирки (по 500 мкл);
- полимераза ТехноТаq MAX – 1 пробирка (48 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл)
- положительный контрольный образец «К+ DQ FAM» – 1 пробирка (100 мкл);
- положительный контрольный образец «К+ DQ HEX» – 1 пробирка (100 мкл);

2.4 Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки) – от 2,5 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность анализа

Комплект реагентов для типирования гена DQA1 выявляет следующие 8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601). Перечень выявляемых аллелей приведён в таблице 2.

В образцах биологического материала человека после завершения реакции амплификации программное обеспечение для приборов ДТлайт[1], ДТпрайм[2] и ДТ-96 определяет генотип исследуемого образца. Интерпретация результатов анализа проводится ПО автоматически.

[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

Таблица 2 – Обозначение аллелей и групп аллелей

Обозначение аллеля/ группы аллелей	Аллели, входящие в группу	
	Названия аллелей согласно номенклатуре HLA, принятой до 1 апреля 2010 г.	Названия аллелей согласно номенклатуре HLA, принятой с 1 апреля 2010 г.
DQA1*0101	DQA1*0101/*0104/*0105/ *0107/*0112	DQA1*01:01/*01:04/*01:05/ *01:07/01:12
DQA1*0102	DQA1*0102/*0106/0108/ *0109/*0111	DQA1*01:02/*01:06/*01:08/ *01:09/*01:11
DQA1*0103	DQA1*0103/*0110	DQA1*01:03/*01:10
DQA1*0201	DQA1*0201	DQA1*02:01
DQA1*0301	DQA1*0301 - *0303	DQA1*03:01 - *03:03
DQA1*0401	DQA1*0401 - *0404	DQA1*04:01 - *04:04
DQA1*0501	DQA1*0501-*0511	DQA1*05:01-*05:11
DQA1*0601	DQA1*0601/*0602	DQA1*06:01/ *06:02

3.2 Чувствительность анализа

Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу комплекта реагентов.

Для оценки количества выделенной ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени (КВМ) производства ООО «НПО ДНК-Технология».

Примечание - При использовании комплекта реагентов для типирования гена DQA1 совместно с комплектом реагентов для типирования гена DRB1 можно учитывать результаты определения КВМ, полученные при использовании комплекта реагентов для типирования DRB1. Если полученное для КВМ значение Ср более 32,0, оператор должен трактовать это как недостаточное для анализа количество ДНК.

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

3.3 Диагностическая специфичность составляет 100 (98,7 – 100) %.

4 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.

Выделение ДНК следует проводить в ламинарных шкафах с включённым ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР с использованием комплекта реагентов следует проводить в ПЦР-боксах.

При работе с комплектами реагентов при удалении отходов после амплификации (пробирок содержащих продукты ПЦР) запрещается открытие пробирок, та как это может привести к разбрызгиванию содержимого и контаминации продуктами ПЦР оборудования, реагентов и лабораторной зоны.

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

Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением

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

дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.

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

При использовании набора 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».

Не использовать комплект реагентов:

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

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для проведения исследования с использованием комплекта реагентов для типирования гена DQA1 требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий (ДТлайт[3], ДТпрайм[4] или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)) ;

[3] – только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2.
[4] – только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6.

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

- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 0,2 мл для амплификации или стрипованные пробирки (стрипы) объёмом 0,2 мл для амплификации;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок (стрипов) объёмом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 10 до 100 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл и 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА или ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА (ООО «НПО ДНК-Технология»)).

Программное обеспечение для детектирующих амплификаторов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

- версия ПО не ниже 7.5.5.23, рекомендуемая версия 7.7.5.44[5];

[5] – по мере обновления программного обеспечения рекомендуемая версия ПО может измениться. Последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/po/

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

- файл с параметрами анализа «HLA.ini» (версия не ниже «HLA_20131111.ini»).

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту для выделения ДНК из биологического материала.

6.2 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 динатриевой 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.

6.3 Транспортирование и хранение исследуемого материала

Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА и ПРОБА-РАПИД-

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

ГЕНЕТИКА. Комплект ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА рекомендуется использовать в случае, если предполагается длительное хранение выделенной ДНК (до шести месяцев). ДНК, полученную с использованием комплекта ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА, следует хранить не более одного месяца.

Полученную ДНК также можно использовать для определения генетических полиморфизмов.

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с комплектом для типирования гена DQA1 можно узнать у представителя компании.

Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из периферической крови необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать физиологический раствор в объёме согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК).

7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

7.2.1 Промаркируйте по 4 пробирки для амплификации объёмом 0,2 мл для каждого анализируемого образца и отрицательного контрольного образца (К–), положительного контрольного образца «К+ DQ FAM» и положительного контрольного образца «К+ DQ HEX».

Например, необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 20 пробирок для исследуемых образцов и 12 пробирок для «К–», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX». Общее количество пробирок – 32.

7.2.2 Встряхните пробирки со смесями для амплификации в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

7.2.3 Внесите в промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации (соответственно маркировке в пробирку 1 внесите смесь DQA1-1, в пробирку 2 – смесь DQA1-2 и т.д.).

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

7.2.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаq MAX в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq MAX необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

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

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

где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К–», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX».

Например, необходимо проанализировать 5 образцов, «К–», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX». Промаркированных пробирок – 32. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX для 33 (32+1) пробирок, т.е. 330 мкл ПЦР-буфера + 16,5 мкл полимеразы ТехноТаq MAX.

7.2.6 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.2.7 Добавьте в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX.

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

7.2.8 Добавьте в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.

7.2.9 Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их

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

перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (4 шт. для каждого образца) по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК.

7.2.10 Внесите в пробирки, маркированные «К–», по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК. Внесите в пробирки, маркированные «К+ DQ FAM», по 5,0 мкл положительного контрольного образца «К+ DQ FAM». Внесите в пробирки, маркированные «К+ DQ HEX», по 5,0 мкл положительного контрольного образца «К+ DQ HEX».

7.2.11 Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1–3 сек.

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

7.2.13 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «HLA.ini» (7.3). Далее и при последующих постановках добавьте в протокол тест «DQA1» (7.4), укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе положительных и отрицательных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (7.4.6) и проведите ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Версия ini файла должна быть не ниже «HLA_20131111.ini».

При выборе теста «DQA1» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

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

Таблица 3 - Программа амплификации для детектирующих амплификаторов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

№ блока	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Δt,°С	Тип блока
1	80,0	2	00	1			Цикл
	94,0	5	00				
2	94,0	0	30	5			Цикл
	64,0	0	15		√		
3	94,0	0	10	45			Цикл
	64,0	0	15		√		
4	94,0	0	5	1			Цикл
5	25,0	0	30	1			Цикл
6	25,0	0	15	50	√	1,0 °С	«Кривая плавления», Δt=1 °С; Ткон=75 °С
7	10,0	...	...	Хранение			Хранение

7.3 Загрузка теста «DQA1» для детектирующих амплификаторов при первой постановке на данном компьютере

ВНИМАНИЕ!

1. Версия теста «DQA1» должна быть не ниже 2.1.
2. Версия ПО не ниже 7.5.5.23, рекомендуемая версия 7.7.5.44[6].

Примечание - Для иллюстраций настоящей инструкции использованы скриншоты версий 7.5.5.23, 7.7.5.44.

Тест «DQA1» (файл «HLA.ini») для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 предоставляется производителем комплекта. Его установку в программу RealTime_PCR

[6] – по мере обновления программного обеспечения рекомендуемая версия ПО может измениться. Последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/po/

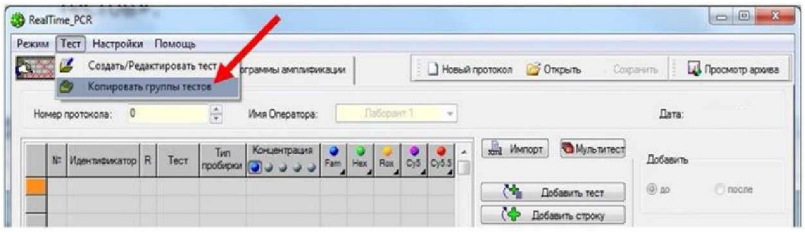
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

необходимо производить в режиме «Работа с прибором» в следующем порядке:

7.3.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с комплектом реагентов для типирования гена DQA1, выберите режим «Работа с прибором».

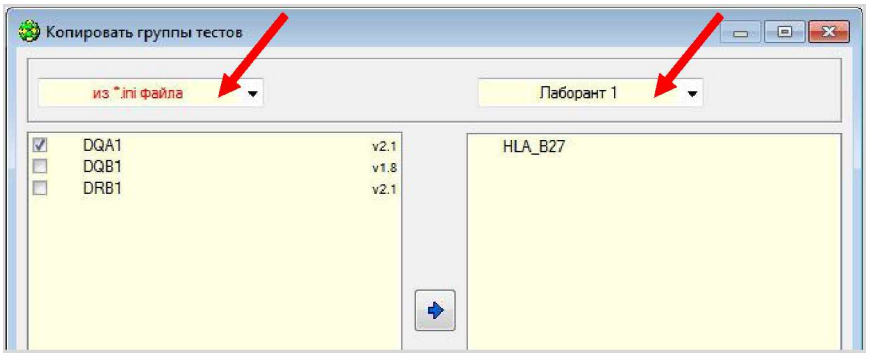
При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.

7.3.2 В меню «Тест» выберите закладку «Копировать группы тестов».



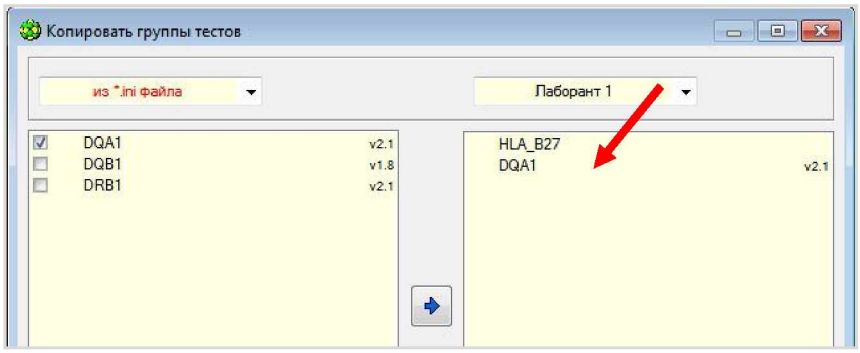
7.3.3 В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл «HLA».

7.3.4 В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которому необходимо скопировать тест «DQA1».



7.3.5 Выберите тест для копирования. Нажмите кнопку , после чего выбранный тест появится в правой половине окна.

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

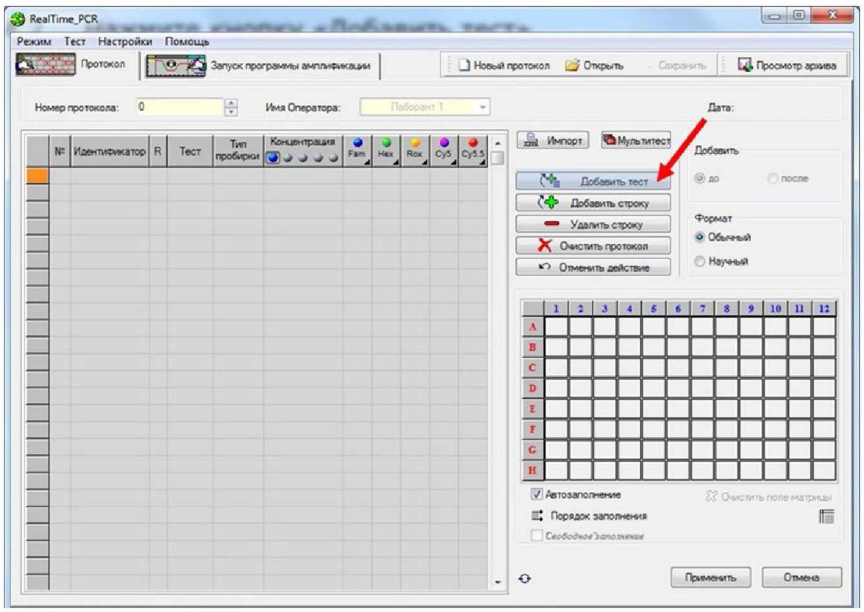


Теперь с тестом «DQA1» может работать оператор, для которого был скопирован тест.

7.4 Ежедневная работа с тестом «DQA1»

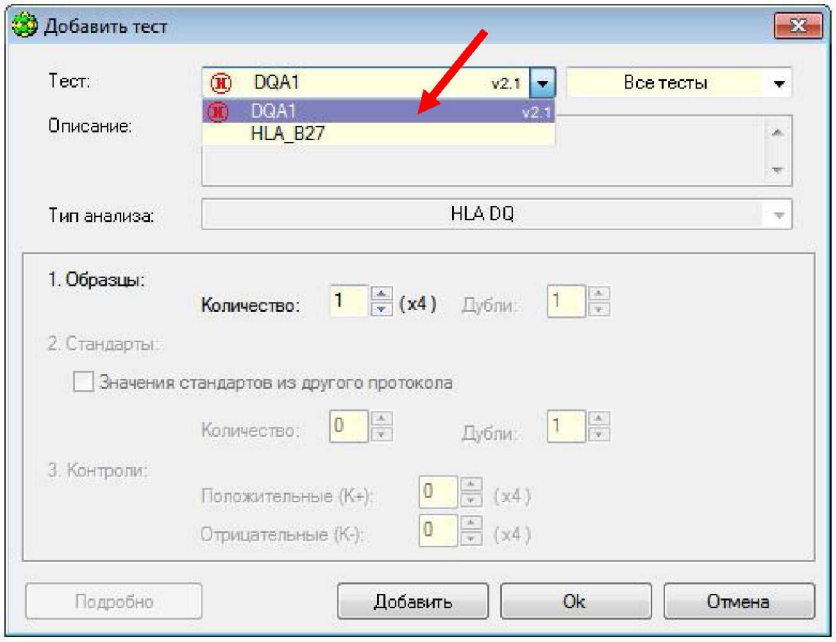
7.4.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, для которого копировали тест (см. 7.3.4), выберите режим «Работа с прибором».

7.4.2 Нажмите кнопку «Добавить тест».

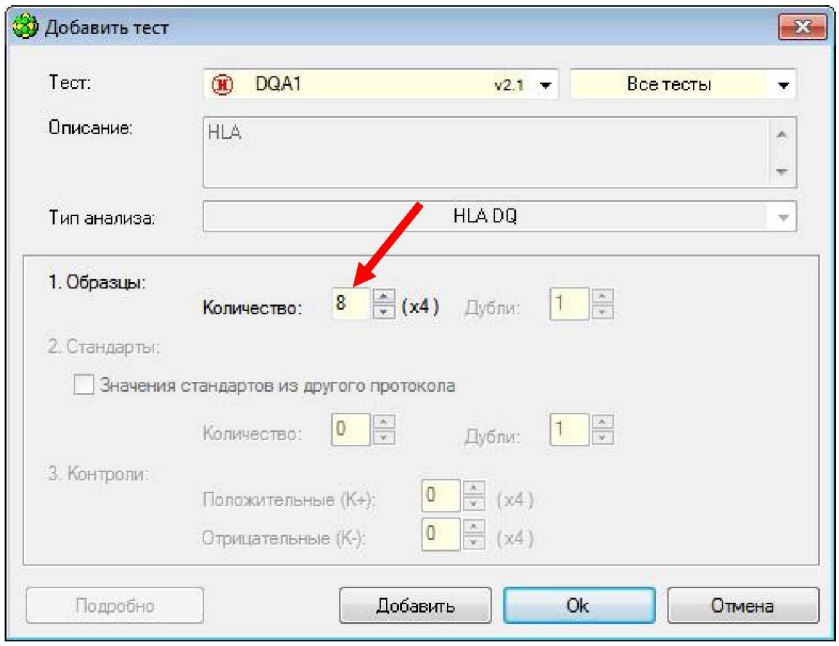


7.4.3 Выберите из списка тест «DQA1».

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

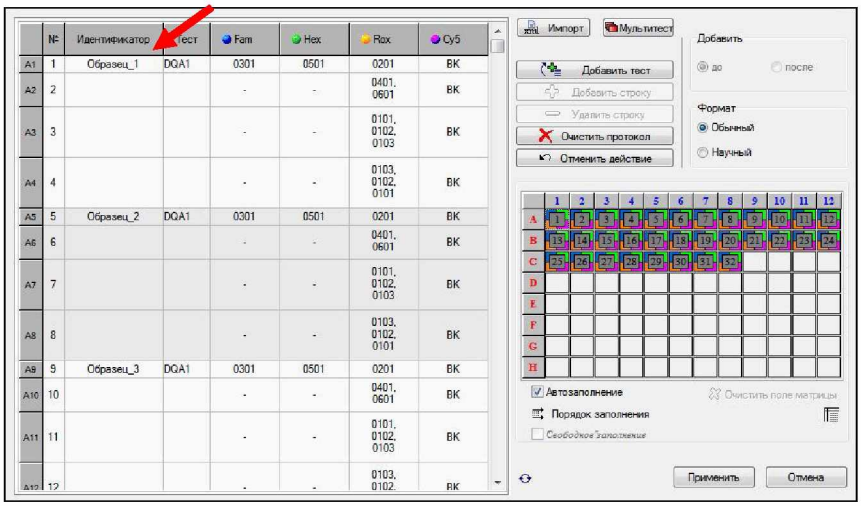


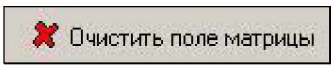
7.4.4 Укажите количество исследуемых образцов (отрицательные и положительные контрольные образцы следует указывать как образцы), нажмите кнопку «Ok».



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

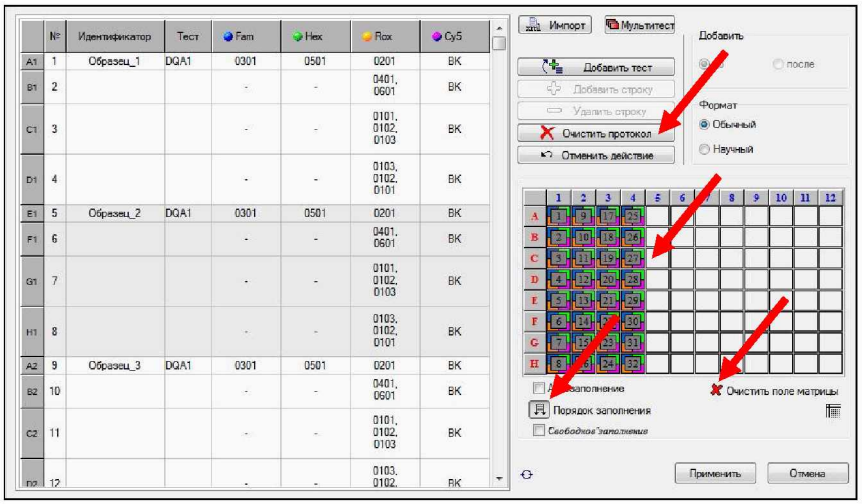
7.4.5 Укажите идентификаторы пробирок.



7.4.6 Отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (при ошибочном заполнении нажмите кнопки «Очистить поле матрицы» – 

или «Очистить протокол» 

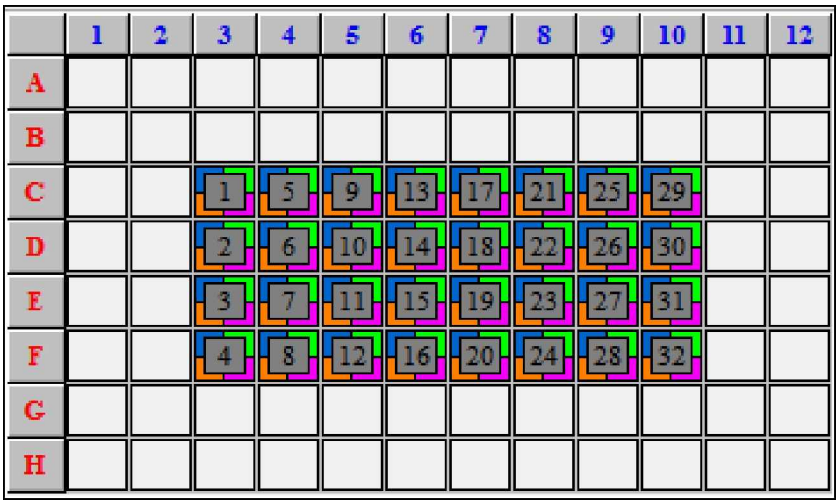
и «Порядок заполнения» – ).



Если термоблок не заполнен полностью, рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для

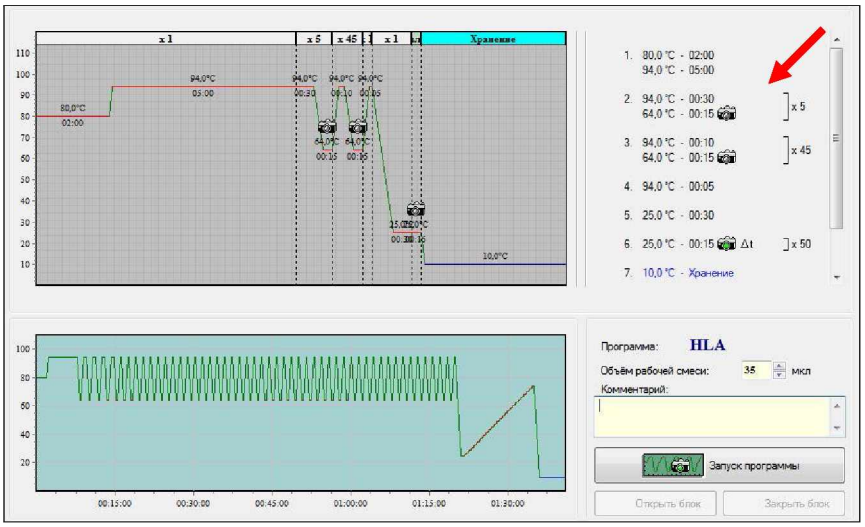
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой термоблока.



7.4.7 Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол».

7.4.8 В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации «HLA».



7.4.9 Нажмите кнопку «Запуск программы» в правом нижнем углу окна.

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

7.4.10 Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора, см. 7.3.1).

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

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

После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6 части 1 («Работа с прибором») Руководства по эксплуатации для амплификаторов детектирующих). Анализ проводится программным обеспечением.

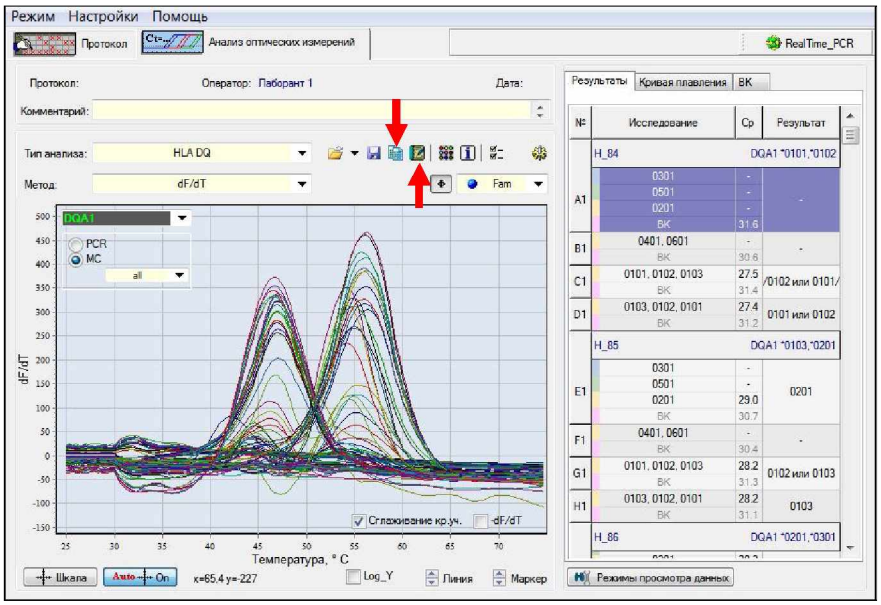
На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла (режим PCR) или от температуры плавления (режим MC) для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторный цикл (Cp) для специфического продукта и ВК, результат по каждому образцу (качественный анализ или анализ кривых плавления для каждой пробирки и генотип для образца).

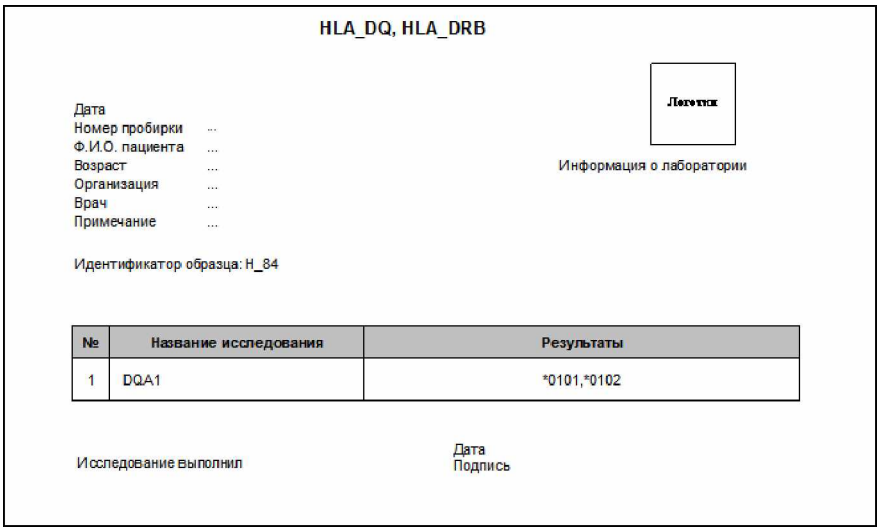
По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчет.

Для создания лабораторного отчета необходимо нажать кнопку «Отчёт» .

Для получения бланка ответа необходимо нажать кнопку «Бланк ответа».

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





HLA_DQ, HLA_DRB

Логотип

Дата
Номер пробирки ...
Ф.И.О. пациента ...
Возраст ...
Организация ...
Врач ...
Примечание ...

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: H_84

№	Название исследования	Результаты
1	DQA1	*0101,*0102

Исследование выполнил

Дата
Подпись

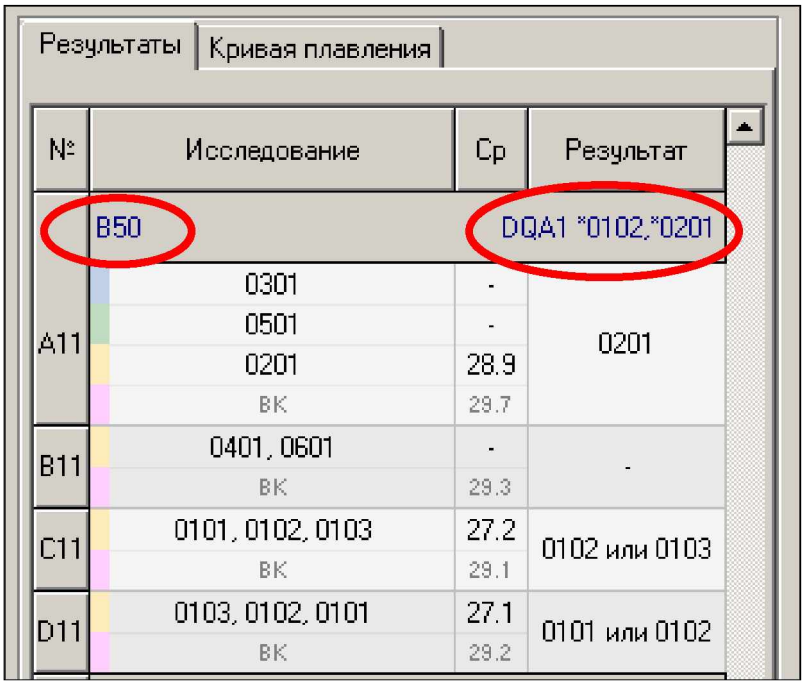
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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

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

9.2 Специфичности гена HLA DQA1 для каждого образца вычисляются программным обеспечением автоматически с учётом результатов по каждой пробирке для этого образца.

9.3 Результат по каждой амплификационной пробирке данного образца не является генотипом образца. Результат генотипирования указан в верхней графе таблицы справа рядом с идентификатором образца.



№	Исследование	Ср	Результат
	B50		DQA1 *0102,*0201
A11	0301	-	0201
	0501	-	
	0201	28.9	
	BK	29.7	
B11	0401, 0601	-	-
	BK	29.3	
C11	0101, 0102, 0103	27.2	0102 или 0103
	BK	29.1	
D11	0103, 0102, 0101	27.1	0101 или 0102
	BK	29.2	

На приведённом примере для образца B50, определён итоговый результат генотипирования: DQA1*0102, *0201.

ВНИМАНИЕ! В случае получения гомозиготного генотипа, для достоверности рекомендуется повторить исследование из того же препарата ДНК.

9.4 В случае получения недостоверных или сомнительных результатов генотипирования («?» или «нд») необходимо либо повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР для этого образца, либо повторное взятие клинического материала у пациента (выполняется последовательно).

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

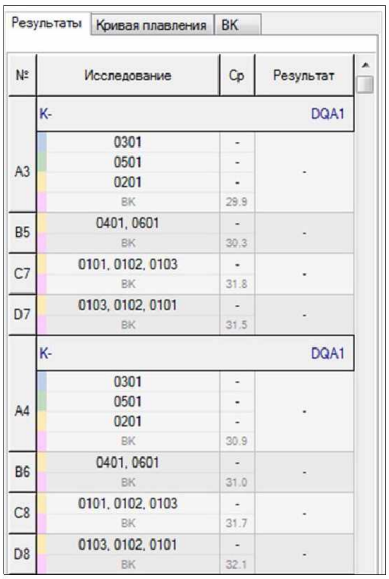
Примечание - Для оценки количества выделенной ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени (КВМ).

9.5 Для отрицательных и положительных контрольных образцов должны быть получены результаты, указанные в таблице 4.

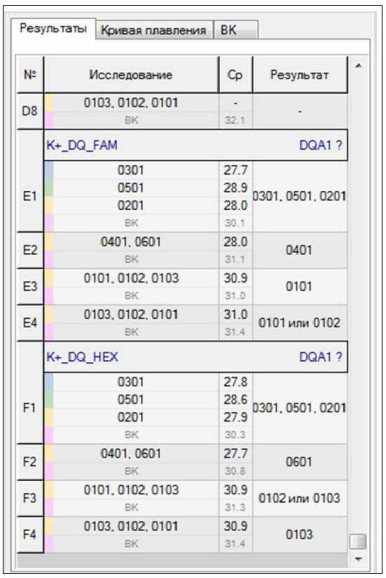
Таблица 4 - Результаты генотипирования отрицательных и положительных контрольных образцов

Идентификатор образца	№ пробирки	Результат по специфике			Результат по ВК	Плавление	Результат генотипирования
		FAM	HEX	ROX	Cy5		
K-	DQA1-1	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср указан ВК	-	-
	DQA1-2	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
	DQA1-3	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
	DQA1-4	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
K+ DQ FAM	DQA1-1	Ср указан 0301	Ср указан 0501	Ср указан 0201	Ср указан ВК	-	?
	DQA1-2	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0401	
	DQA1-3	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0101	
	DQA1-4	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0101 или 0102	
K+ DQ HEX	DQA1-1	Ср указан 0301	Ср указан 0501	Ср указан 0201	Ср указан ВК	-	?
	DQA1-2	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0601	
	DQA1-3	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0102 или 0103	
	DQA1-4	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0103	

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



№	Исследование	Ср	Результат
	K-		DQA1
A3	0301	-	-
	0501	-	
	0201	-	
	BK	29.9	
B5	0401, 0601	-	-
	BK	30.3	
C7	0101, 0102, 0103	-	-
	BK	31.8	
D7	0103, 0102, 0101	-	-
	BK	31.5	
	K-		DQA1
A4	0301	-	-
	0501	-	
	0201	-	
	BK	30.9	
B6	0401, 0601	-	-
	BK	31.0	
C8	0101, 0102, 0103	-	-
	BK	31.7	
D8	0103, 0102, 0101	-	-
	BK	32.1	



№	Исследование	Ср	Результат
D8	0103, 0102, 0101	-	-
	BK	32.1	
	K+_DQ_FAM		DQA1 ?
E1	0301	27.7	0301, 0501, 0201
	0501	28.9	
	0201	28.0	
	BK	30.1	
E2	0401, 0601	28.0	0401
	BK	31.1	
E3	0101, 0102, 0103	30.9	0101
	BK	31.0	
E4	0103, 0102, 0101	31.0	0101 или 0102
	BK	31.4	
	K+_DQ_HEX		DQA1 ?
F1	0301	27.8	0301, 0501, 0201
	0501	28.6	
	0201	27.9	
	BK	30.3	
F2	0401, 0601	27.7	0601
	BK	30.8	
F3	0101, 0102, 0103	30.9	0102 или 0103
	BK	31.3	
F4	0103, 0102, 0101	30.9	0103
	BK	31.4	

9.6 При получении для положительных контрольных образцов отрицательных значений, не указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.7 При получении для отрицательного контрольного образца положительных значений, не указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ КОМПЛЕКТА

10.1 Транспортирование

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

Примечание – Допускается транспортировка комплекта реагентов на льду не более 72 часов.

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

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

10.2 Хранение

10.2.1 Комплект реагентов, за исключением полимеразы ТехноТаq МАХ, следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

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

10.2.3 Смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности комплекта при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

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

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Комплект реагентов должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению комплекта.

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

- компоненты комплекта, за исключением полимеразы ТехноТаq МАХ, следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках;
- полимеразу ТехноТаq МАХ следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в морозильных камерах в течение всего срока годности комплекта
- смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности комплекта при температуре 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

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

10.3.3 Комплекты с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 Комплекты с истекшим сроком годности и неиспользованные реактивы утилизируют в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

11.2 Непригодные для использования комплекты реагентов, упаковка комплекта реагентов (пробирки, флаконы, полиэтиленовые пакеты с замком и коробки из картона) относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

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

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

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для типирования гена DQA1, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.6, тел./факс +7 (495) 640-17-71.

Служба клиентской поддержки:
8 800 200-75-15 (для России, звонок бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).
E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

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

Адрес производителя и место производства:
ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская область, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.

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

Приложение А
(справочное)

Символы, используемые при маркировке набора

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

Номер: 204-6
12.05.17

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

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

ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс +7 (495) 640-17-71
Служба клиентской поддержки:
8 800 200-75-15 (для России, звонок бесплатный)
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный)
E-mail: hotline@dna-technology.ru

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

ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

U

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК

HLA-ДНК-ТЕХ

Комплект реагентов для типирования гена DQB1

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/03891 от 10 мая 2017 года

Фасовка:
универсальная (U)

Каталожный номер:
R1-H003-N3/5 (24 определения)

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

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

ВВЕДЕНИЕ

Система генов тканевой совместимости человека (HLA) является одной из наиболее полиморфных генетических систем, выполняющей в организме человека ряд функций. Обеспечивая регуляцию иммунного ответа, система HLA осуществляет генетический контроль взаимодействия всех иммунокомпетентных клеток организма, распознавание своих и чужеродных (в том числе измененных собственных) клеток, запуск и реализацию иммунного ответа и, в целом, обеспечивает выживание человека как вида в условиях экзогенной и эндогенной агрессии. Многообразие указанных функций обеспечивается особенностями строения главного комплекса гистосовместимости. Одна из этих особенностей – выраженный аллельный полиморфизм комплекса генов HLA.

Комплекс генов HLA компактно расположен на коротком плече 6 аутосомной хромосомы и занимает 3500 килобаз (kb). В состав HLA входит три группы генов, кодирующие, соответственно, три группы белковых продуктов (молекул). Молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса (A, B, C) присутствуют на поверхности всех типов клеток, кроме эритроцитов и клеток трофобласта, они участвуют в процессе презентации пептидов мутантных, трансформированных и инфицированных вирусом клеток собственного организма, и соответственно дальнейшей элиминации таких клеток. Молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса (DP, DM, DQ, DR) участвуют в процессе презентации чужеродных пептидов, например бактериальных, и соответственно в процессе развития иммунного ответа. Такие молекулы экспрессируются лишь немногими типами клеток, выполняющими функции антигенпредставляющих клеток (АПК), а именно В-лимфоцитами, активированными Т-клетками, макрофагами, дендритными клетками и клетками Лангерганса. Молекулы главного комплекса гистосовместимости III класса являются компонентами системы комплемента и других белков, присутствующих в крови.

Научное обоснование

Ген HLA-DQB1 относится к генам гистосовместимости человека (HLA) II класса, обладает экстремальным полиморфизмом. Известно более 900 аллелей данного гена, сгруппированных в 12 групп аллелей DQB1 (DQB1*02, *0301, *0302, *0303, *0304, *0305, *0401/*0402, *0501, *0502/*0504, *0503, *0601, *0602-8).

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

Генотипирование по локусу DQB1 на уровне групп аллелей (low resolution, низкое разрешение) достаточно для большинства приложений результатов генотипирования, в частности используется для подбора тканесовместимых донора и реципиента при первичных трансплантациях органов, например почек. Показано, что такой уровень генотипирования является достаточным и соответствует стандартам передовых трансплантологических центров мира.

Медицинское обоснование

Трансплантация органов и тканей. Генотипирование по локусам DRB1, DQA1 и DQB1 на уровне групп аллелей используется для подбора тканесовместимых донора и реципиента при первичных трансплантациях органов, для подбора потенциального донора при родственных пересадках гемопоэтических стволовых клеток, а также для первичного скрининга потенциального донора при неродственных пересадках гемопоэтических стволовых клеток.

Репродуктивные проблемы. Различие супругов по вариантам генов HLA является одним из важных условий успешного наступления и вынашивания беременности. Сходство супругов между собой по вариантам HLA ведёт к увеличению вероятности появления зародыша с двойным набором одинаковых вариантов генов, то есть HLA-гомозигот, что является неблагоприятным фактором, следствием чего могут быть репродуктивные потери. Поэтому для диагностики причин репродуктивных неудач используют HLA-типирование супругов, чтобы установить сходство между ними по вариантам генов HLA.

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

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов для типирования гена DQB1

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов HLA-ДНК-ТЕХ предназначен для определения специфичностей главного комплекса тканевой совместимости человека на уровне генов методом полимеразной цепной реакции в биологическом материале человека (периферическая кровь) с использованием детектирующих амплификаторов.

Полученные результаты могут быть использованы для подбора гистосовместимого донора при трансплантации органов и тканей, для генетического прогнозирования иммуноопосредованных заболеваний и нарушений репродукции

1.2 Комплект реагентов для типирования гена DQB1 предназначен для одновременного определения 12 групп аллелей гена DQB1 главного комплекса тканевой совместимости человека.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 Принцип действия

Исследования проводятся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В основе работы комплекта 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 достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную

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

метку 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) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

В некоторые смеси для амплификации введены сигнальные зонды, содержащие флуоресцентные метки Fam и Hex. 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 совокупных данных о пороговых циклах амплификации и температуры плавления сигнальных зондов проводится интерпретация результатов анализа.

Комплект реагентов для типирования гена DQB1 включает смеси для амплификации, специфичные для 12 групп аллелей гена DQB1 (DQB1*02, *0301, *0302, *0303, *0304, *0305, *0401/*0402, *0501, *0502/*0504, *0503, *0601, *0602-8), в состав которых в том числе входит внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции специфичностей гена DQB1, включены флуоресцентные метки Fam, Hex и Rox. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации внутреннего контрольного образца (ВК), входит флуоресцентный краситель Cy5 (таблица 1). Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты

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

разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Таблица 1 - Каналы детекции продуктов амплификации

Название смеси для амплификации	Каналы детекции аллельных вариантов и внутреннего контроля				
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
DQB1-1	03	0401/0402	02	ВК	-
DQB1-2	05	0601	0602-8	ВК	-
DQB1-3	-	-	0302 или 0303	ВК	-
DQB1-4	-	-	0301 или 0304	ВК	-
DQB1-5	0305 или 0401/0402	-	-	ВК	-
DQB1-6	0501	0503	0502/0504	ВК	-

Для контроля качества проведения исследования используют контрольные образцы «K+ DQ FAM» и «K+ DQ HEX», представляющие собой смеси клонированных участков генов HLA-DQA1 и HLA-DQB1, выявляемых с применением комплекта.

Исследование с использованием комплекта реагентов для типирования гена DQB1 состоит из этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация в режиме реального времени.

2.2 Комплект реагентов рассчитан на 24 определения, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Состав комплекта

Комплект реагентов для типирования гена DQB1 выпускается в универсальной фасовке (маркируется – фасовка U) и включает следующие компоненты:

– Смеси для амплификации:

- DQB1-1 – 1 пробирка (480 мкл);
- DQB1-2 – 1 пробирка (480 мкл);
- DQB1-3 – 1 пробирка (480 мкл);

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

- DQB1-4 – 1 пробирка (480 мкл);
- DQB1-5 – 1 пробирка (480 мкл);
- DQB1-6 – 1 пробирка (480 мкл);

– полимераза ТехноТаq MAX – 1 пробирка (72 мкл);

– ПЦР-буфер – 1 пробирка (1,44 мл);

– минеральное масло – 1 пробирка (2,88 мл);

– положительный контрольный образец («К+ DQ FAM») – 1 пробирка (100 мкл);

– положительный контрольный образец («К+ DQ HEX») – 1 пробирка (100 мкл).

2.4 Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки) – от 2,5 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность анализа

Комплект реагентов для типирования гена DQB1 выявляет следующие группы аллелей гена DQB1 (DQB1*02, *0301, *0302, *0303, *0304, *0305, *0401/*0402, *0501, *0502/*0504, *0503, *0601, *0602-8). Перечень определяемых аллелей приведён в таблице 2.

В образцах биологического материала человека после завершения реакции амплификации программное обеспечение для приборов ДТлайт[1], ДТпрайм[2] и ДТ-96 определяет генотип исследуемого образца. Интерпретация результатов анализа проводится ПО автоматически.

[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

Таблица 2 - Обозначения аллелей и групп аллелей

Обозначение аллеля/группы аллелей	Аллели, входящие в группу[3]	
	Названия аллелей согласно номенклатуре HLA, принятой до 1 апреля 2010 г.	Названия аллелей согласно номенклатуре HLA, принятой с 1 апреля 2010 г.
DQB1*02	*0201-*0248	*02:01-*02:48
DQB1*0301	*0301/*0309…	*03:01/*03:09…
DQB1*0302	*0302/*0307/*0308…	*03:02/*03:07/*03:08…
DQB1*0303	*0303/*0306…	*03:03/*03:06…
DQB1*0304	*0304…	*03:04…
DQB1*0305	*0305…	*03:05…
DQB1*0401/*0402	*0401/*0402/*0404-*0425N	*04:01/*04:02/*04:04-*04:25N
DQB1*0501	*0501/*0507/*0511/*0512/ *0518…	*05:01/*05:07/*05:11/*05:12/ *05:18…
DQB1*0502/*0504	*0502/*0504/*0505/*0514/ *0517…	*05:02/*05:04/*05:05/*05:14/ *05:17…
DQB1*0503	*0503/*0506/*0508-*0510/ *0513…	*05:03/*05:06/*05:08-*05:10/ *05:13…
DQB1*0601	*0601…	*06:01…
DQB1*0602-8	*0602-*0610…	*06:02-*06:10…

3.2 Чувствительность анализа

Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу комплекта.

Для оценки количества выделенной ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени (КВМ) производства ООО «НПО ДНК-Технология».

Примечание - При использовании комплекта реагентов для типирования гена DQB1 совместно с комплектом реагентов для типирования гена DRB1 можно учитывать результаты определения КВМ, полученные при использовании комплекта реагентов для типирования гена DRB1. Если полученное для КВМ значение

[3] - полный список аллелей входящих в группу предоставляется по запросу.

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

Ср более 32,0, оператор должен трактовать это как недостаточное для анализа количество ДНК.

3.3 Диагностическая специфичность составляет 100 (98,7 – 100) %.

4 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.

Выделение ДНК следует проводить в ламинарных шкафах с включённым ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР с использованием комплекта реагентов следует проводить в ПЦР-боксах.

При работе с комплектами реагентов при удалении отходов после амплификации (пробирок содержащих продукты ПЦР) запрещается открытие пробирок, та как это может привести к разбрызгиванию содержимого и контаминации продуктами ПЦР оборудования, реагентов и лабораторной зоны.

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

Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.)

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

ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.

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

При использовании набора 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».

Не использовать комплект реагентов:

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

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для проведения исследования с использованием комплекта реагентов для типирования гена DQB1 требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий (ДТлайт[4], ДТпрайм[5] или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»));

[4] – только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2.
[5] – только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6.

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

- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 0,2 мл для амплификации или стрипованные пробирки (стрипы) объёмом 0,2 мл для амплификации;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок (стрипов) объёмом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 10 до 100 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл и 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА или ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА (ООО «НПО ДНК-Технология»)).

Программное обеспечение для детектирующих амплификаторов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

- версия ПО не ниже 7.5.5.23[6];

[6] – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/po/

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

- файл с параметрами анализа «HLA.ini» (версия не ниже «HLA_20131111.ini»).

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту для выделения ДНК из биологического материала.

6.2 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 динатриевой 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.

6.3 Транспортирование и хранение исследуемого материала

Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического

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

материала: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА и ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА. Комплект ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА рекомендуется использовать в случае, если предполагается длительное хранение выделенной ДНК (до шести месяцев). ДНК, полученную с использованием комплекта ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА, следует хранить не более одного месяца.

Полученную ДНК также можно использовать для определения генетических полиморфизмов.

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с комплектом для типирования гена DQB1 можно узнать у представителя компании.

Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из периферической крови необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать физиологический раствор в объёме согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК).

7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

7.2.1 Промаркируйте по шесть пробирок для амплификации объёмом 0,2 мл для каждого анализируемого образца, отрицательного контрольного образца (К–), положительного контрольного образца «К+ DQ FAM» и положительного контрольного образца «К+ DQ HEX».

Например, необходимо проанализировать пять образцов. Нужно промаркировать 30 пробирок для исследуемых образцов и 18 пробирок для «К–», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX». Общее количество пробирок – 48.

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 (соответственно маркировке в пробирку 1 внесите смесь DQB1-1, в пробирку 2 – смесь DQB1-2 и т.д.).

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

7.2.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаq MAX в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq MAX необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

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

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

где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К–», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX».

Например, необходимо проанализировать пять образцов, «К–», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX». Промаркированных пробирок – 48. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX для 49 (48+1) пробирок, т.е. 490 мкл ПЦР-буфера + 24,5 мкл полимеразы ТехноТаq MAX.

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

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.2.7 Добавьте в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX в пробирки со смесями для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить 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 Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их

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

перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (6 шт. для каждого образца) по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК.

7.2.10 Внесите в пробирки, маркированные «К–», по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК. Внесите в пробирки, маркированные «К+ DQ FAM», по 5,0 мкл положительного контрольного образца «К+ DQ FAM». Внесите в пробирки, маркированные «К+ DQ HEX», по 5,0 мкл положительного контрольного образца «К+ DQ HEX».

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

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

7.2.13 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режим «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «HLA.ini» (7.3). Далее и при последующих постановках добавьте в протокол тест «DQB1» (7.4), укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательных и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (7.4.6) и проведите ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Версия ini файла должна быть не ниже «HLA_20131111.ini».

При выборе теста «DQB1» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

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

Таблица 3 - 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	80,0	2	00	1			Цикл
	94,0	5	00				
2	94,0	0	30	5			Цикл
	64,0	0	15		√		
3	94,0	0	10	45			Цикл
	64,0	0	15		√		
4	94,0	0	5	1			Цикл
5	25,0	0	30	1			Цикл
6	25,0	0	15	50	√	1,0 °С	«Кривая плавления», Δt=1 °С; Ткон=75 °С
7	10,0	…	…	Хранение			Хранение

7.3 Загрузка теста «DQB1» для детектирующих амплификаторов при первой постановке на данном компьютере.

ВНИМАНИЕ!

1. Версия теста «DQB1» должна быть не ниже 1.8.
2. Версия ПО не ниже 7.5.5.23[7].

Примечание - Для иллюстраций настоящей инструкции использованы скриншоты версий 7.5.5.23 и 7.7.5.44.

Тест «DQB1» (файл «HLA.ini») для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 предоставляется производителем комплекта. Его установку в программу RealTime_PCR необходимо производить в режиме «Работа с прибором» в следующем порядке:

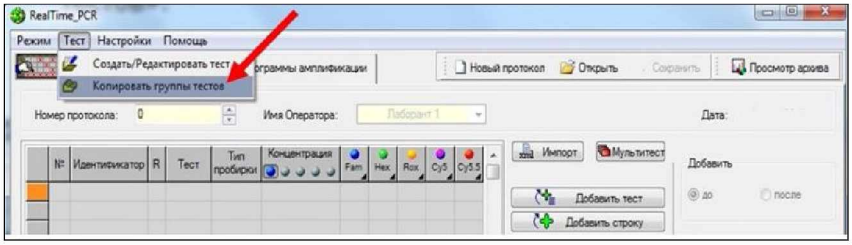
[7] – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/po/

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

7.3.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с комплектом реагентов для типирования гена DQB1, выберите режим «Работа с прибором».

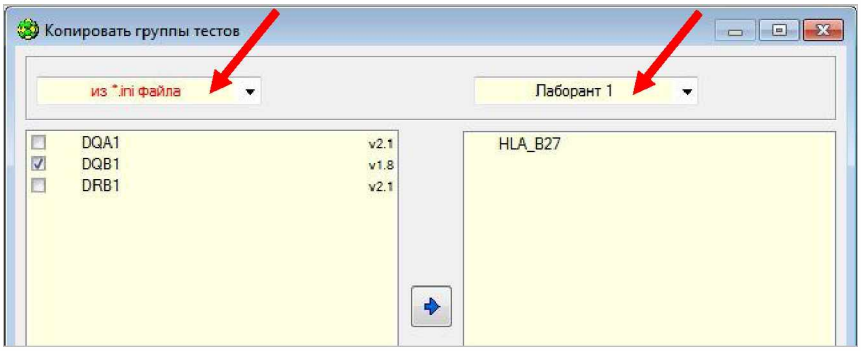
При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.

7.3.2 В меню «Тест» выберите закладку «Копировать группы тестов».



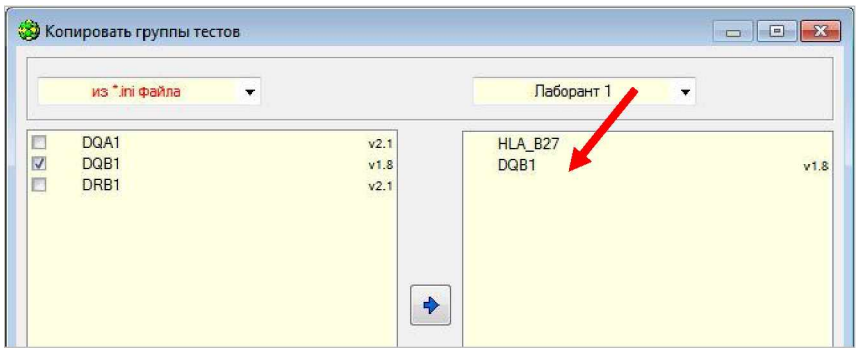
7.3.3 В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл «HLA.ini».

7.3.4 В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которому необходимо скопировать тест «DQB1».



7.3.5 Выберите тест для копирования. Нажмите кнопку , после чего выбранный тест появится в правой половине окна.

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

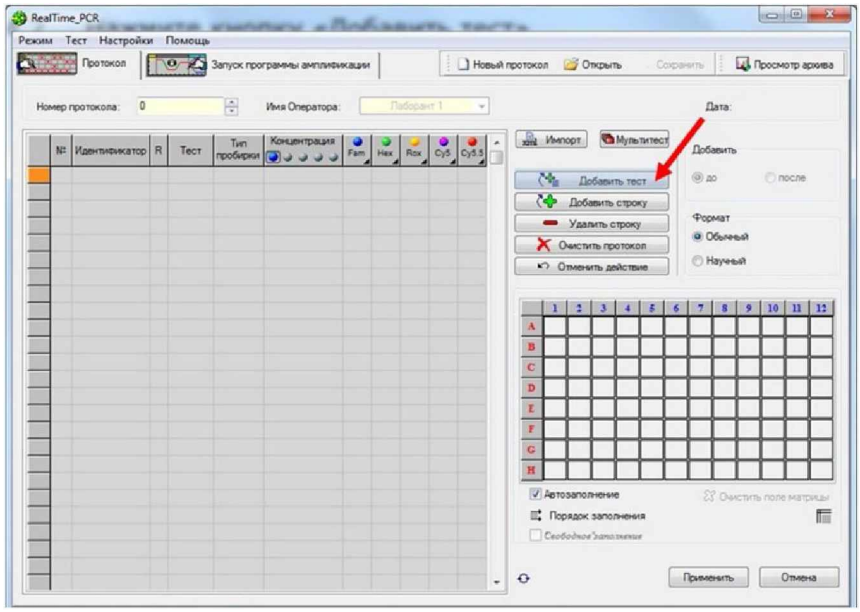


Теперь с тестом «DQB1» может работать оператор, для которого был скопирован тест.

7.4 Ежедневная работа с тестом «DQB1»

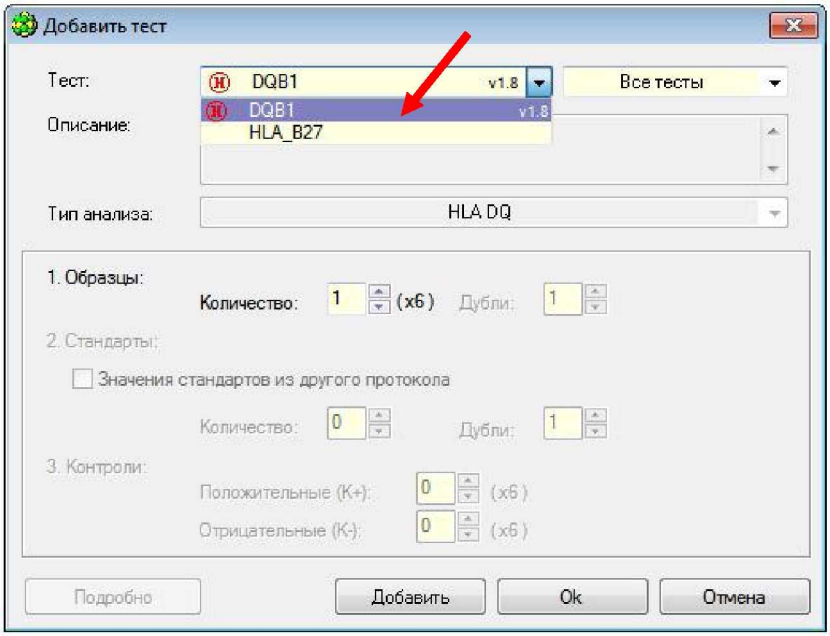
7.4.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, для которого копировали тест (7.3.4), выберите режим «Работа с прибором».

7.4.2 Нажмите кнопку «Добавить тест».

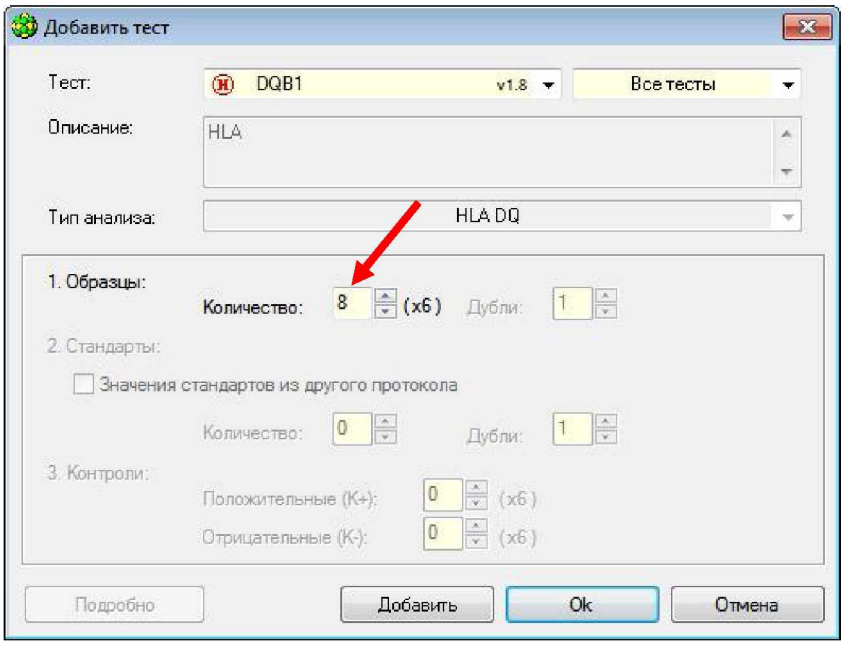


7.4.3 Выберите из списка тест «DQB1».

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

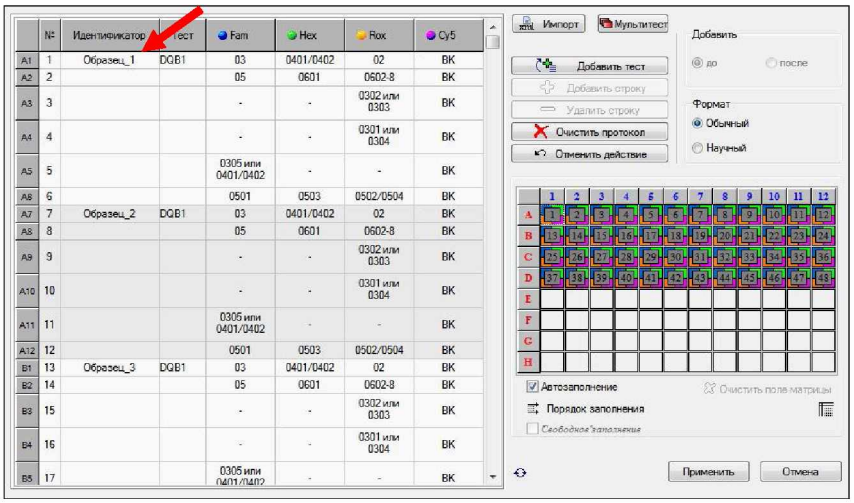


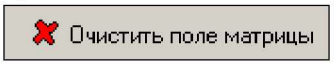
7.4.4 Укажите количество исследуемых образцов (отрицательные контрольные образцы следует указывать как образцы), нажмите кнопку «Ок».



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

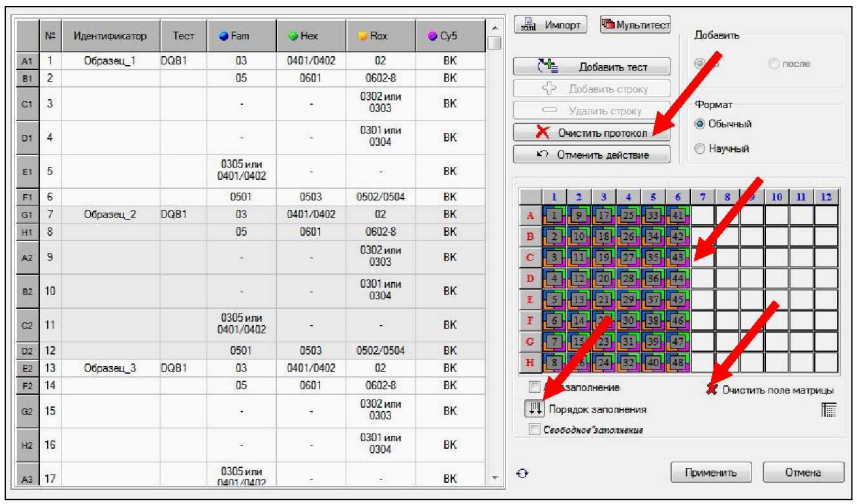
7.4.5 Укажите идентификаторы пробирок.



7.4.6 Отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (при ошибочном заполнении протокола нажмите кнопки «Очистить поле матрицы» - 

или «Очистить протокол» 

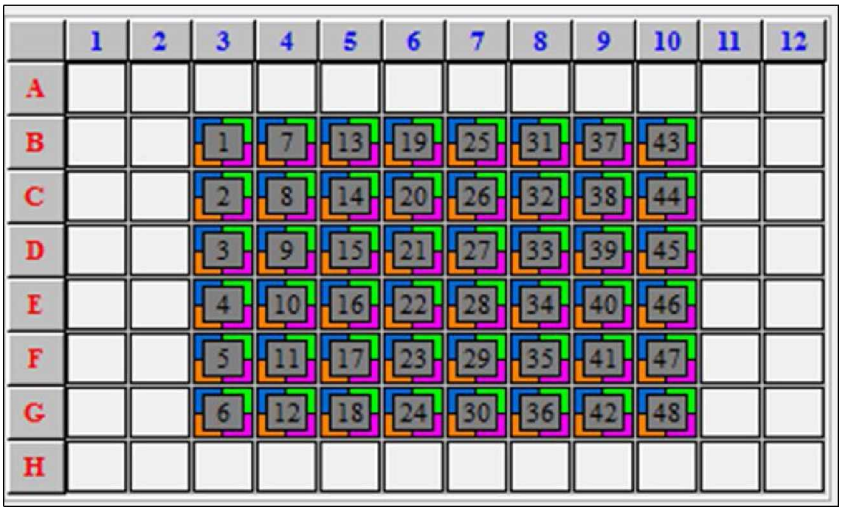
и «Порядок заполнения» – ).



Если термоблок не заполнен полностью, рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для

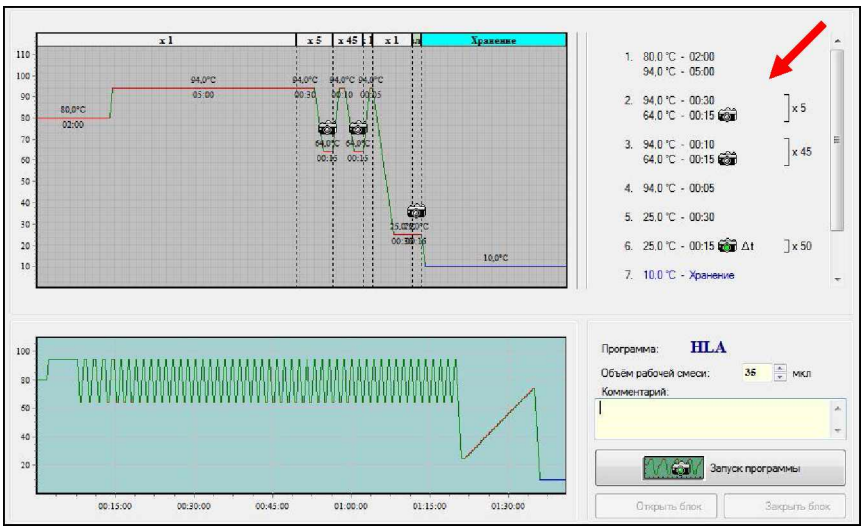
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой термоблока.



7.4.7 Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол».

7.4.8 В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации «HLA».



7.4.9 Нажмите кнопку «Запуск программы» в правом нижнем углу окна.

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

7.4.10 Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора (7.3.1)).

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

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

После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6 части 1 («Работа с прибором») Руководства по эксплуатации для амплификаторов детектирующих). Анализ проводится программным обеспечением.

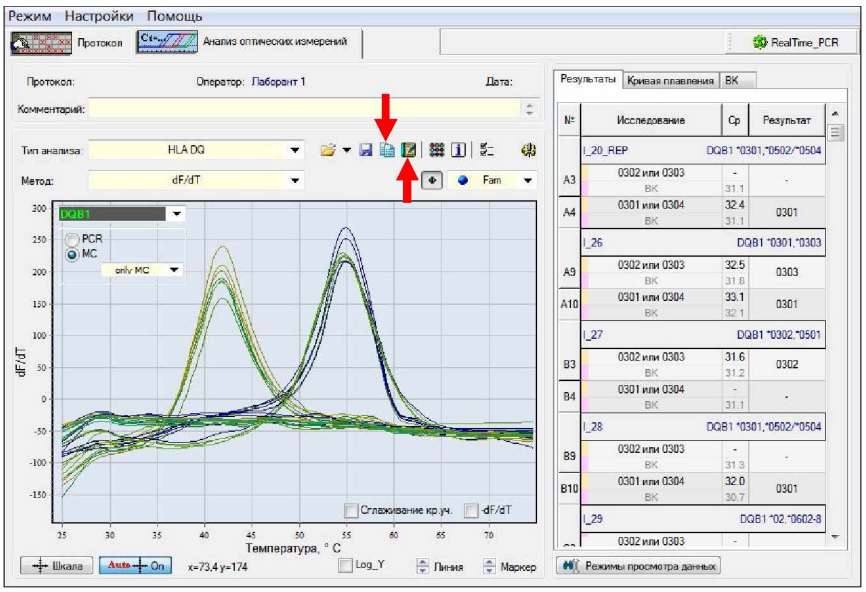
На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла (режим PCR) или от температуры плавления (режим MC) для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторный цикл (Cp) для специфического продукта и ВК, результат по каждому образцу (качественный анализ или анализ кривых плавления для каждой пробирки и генотип для образца).

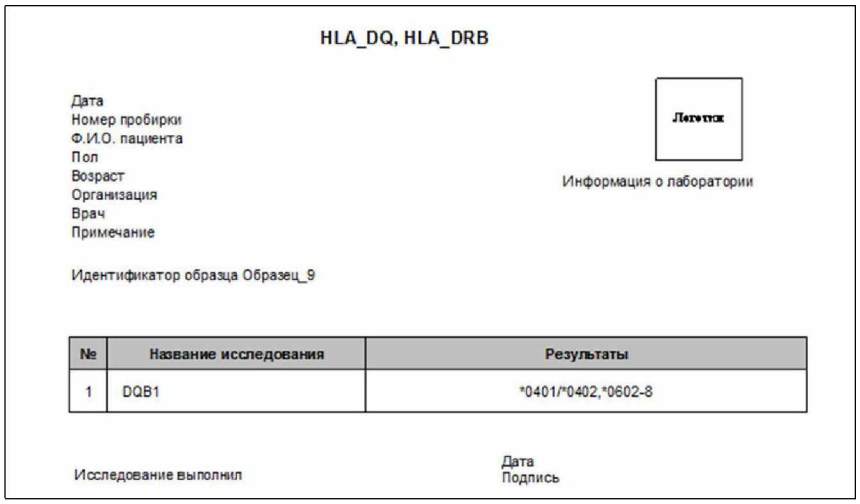
По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчет.

Для создания лабораторного отчета необходимо нажать кнопку «Отчёт» .

Для получения бланка ответа необходимо нажать кнопку «Бланк ответа».

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





HLA_DQ, HLA_DRB

Дата
Номер пробирки
Ф.И.О. пациента
Пол
Возраст
Организация
Врач
Примечание

Логотип

Информация о лаборатории

Идентификатор образца Образец_9

№	Название исследования	Результаты
1	DQB1	*0401/*0402,*0602-8

Исследование выполнил

Дата
Подпись

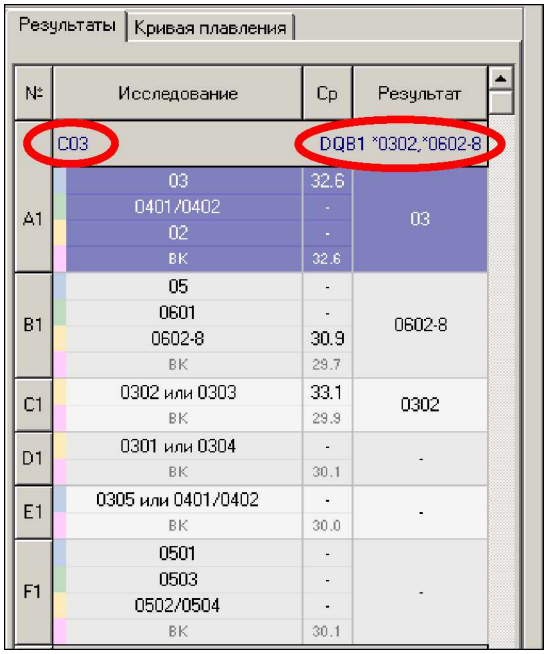
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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

9.2 Специфичности гена HLA DQB1 для каждого образца вычисляются программным обеспечением автоматически с учетом результатов по каждой пробирке для этого образца.

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

9.3 Результат по каждой амплификационной пробирке данного образца не является генотипом образца. Результат генотипирования указан в верхней графе таблицы справа рядом с идентификатором образца.



На приведенном примере для образца C03, определён итоговый результат генотипирования: DQB1*0302, *0602-8.

ВНИМАНИЕ! В случае получения гомозиготного генотипа, для достоверности рекомендуется повторить исследование из того же препарата ДНК.

9.4 В случае получения недостоверных или сомнительных результатов генотипирования («?» или «нд») необходимо либо повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР для этого образца, либо повторное взятие клинического материала у пациента (выполняется последовательно).

Примечание - Для оценки количества выделенной ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени (КВМ).

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

9.5 Для отрицательных и положительных контрольных образцов должны быть получены результаты, указанные в таблице 4.

Таблица 4 - Результаты генотипирования «К-», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX»

Идентификатор образца	№ пробирки	Результат по специфике			Результат по ВК	Плавление	Результат генотипирования
		FAM	HEX	ROX	Cy5		
К-	DQB1-1	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср указан ВК	-	-
	DQB1-2	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср указан ВК	-	
	DQB1-3	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
	DQB1-4	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
	DQB1-5	Ср не указан	-	-	Ср указан ВК	-	
	DQB1-6	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср указан ВК	-	
К+ DQ FAM	DQB1-1	Ср указан 03	Ср указан 0401/0402	Ср указан 02	Ср указан ВК	-	?
	DQB1-2	Ср указан 05	Ср указан 0601	Ср указан 0602-8	Ср указан ВК	-	
	DQB1-3	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0302	
	DQB1-4	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0304	
	DQB1-5	Ср указан 0305 или 0401/0402	-	-	Ср указан ВК	-	
	DQB1-6	Ср указан 0501	Ср указан 0503	Ср указан 0502/0504	Ср указан ВК	-	
К+ DQ HEX	DQB1-1	Ср указан 03	Ср указан 0401/0402	Ср указан 02	Ср указан ВК	-	?
	DQB1-2	Ср указан 05	Ср указан 0601	Ср указан 0602-8	Ср указан ВК	-	
	DQB1-3	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0302,0303	
	DQB1-4	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0301	
	DQB1-5	Ср указан 0305 или 0401/0402	-	-	Ср указан ВК	-	
	DQB1-6	Ср указан 0501	Ср указан 0503	Ср указан 0502/0504	Ср указан ВК	-	

9.6 При получении для положительных контрольных образцов отрицательных значений, не указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.7 При получении для отрицательного контрольного образца положительных значений, не указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии считают

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

недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ КОМПЛЕКТА

10.1 Транспортирование

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

Примечание – Допускается транспортировка комплекта реагентов на льду не более 72 часов.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Комплект реагентов, за исключением полимеразы ТехноТаq MAX, следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

10.2.2 Полимеразу ТехноТаq MAX следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в морозильных камерах в течение всего срока годности комплекта.

10.2.3 Смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности комплекта при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

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

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Комплект реагентов должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению комплекта.

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

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

- компоненты комплекта, за исключением полимеразы ТехноТаq МАХ, следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках;
- полимеразу ТехноТаq МАХ следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в морозильных камерах в течение всего срока годности комплекта
- смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности комплекта при температуре 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

10.3.3 Комплекты с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 Комплекты с истекшим сроком годности и неиспользованные реактивы утилизируют в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

11.2 Непригодные для использования комплекты реагентов, упаковка комплекта реагентов (пробирки, флаконы, полиэтиленовые пакеты с замком и коробки из картона) относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

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

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

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для типирования гена DQB1, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.6, тел./факс +7 (495) 640-17-71.

Служба клиентской поддержки:
8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).
E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

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

Адрес производителя и место производства:
ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская область, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.

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

Приложение А
(справочное)

Символы, используемые при маркировке комплекта

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

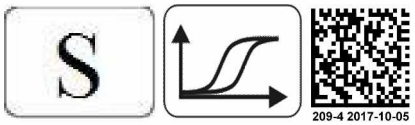
Номер: 206-5
07.08.17

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

ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс +7 (495) 640-17-71
Служба клиентской поддержки:
8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный)
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный)
E-mail: hotline@dna-technology.ru

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

ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК

HLA-ДНК-ТЕХ

Комплект реагентов для типирования гена DRB1

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/03891 от 27 сентября 2017 года

Фасовка:
стандартная (S)

Каталожный номер:
R1-H001-S3/5

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

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

ВВЕДЕНИЕ

Система генов тканевой совместимости человека (HLA) является одной из наиболее полиморфных генетических систем, выполняющей в организме человека ряд функций. Обеспечивая регуляцию иммунного ответа, система HLA осуществляет генетический контроль взаимодействия всех иммунокомпетентных клеток организма, распознавание своих и чужеродных (в том числе измененных собственных) клеток, запуск и реализацию иммунного ответа и, в целом, обеспечивает выживание человека как вида в условиях экзогенной и эндогенной агрессии. Многообразие указанных функций обеспечивается особенностями строения главного комплекса гистосовместимости. Одна из этих особенностей – выраженный аллельный полиморфизм комплекса генов HLA.

Комплекс генов HLA компактно расположен на коротком плече 6 аутосомной хромосомы и занимает 3500 килобаз (kb). В состав HLA входит три группы генов, кодирующие, соответственно, три группы белковых продуктов (молекул). Молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса (A, B, C) присутствуют на поверхности всех типов клеток, кроме эритроцитов и клеток трофобласта, они участвуют в процессе презентации пептидов мутантных, трансформированных и инфицированных вирусом клеток собственного организма, и соответственно дальнейшей элиминации таких клеток. Молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса (DP, DM, DQ, DR) участвуют в процессе презентации чужеродных пептидов, например бактериальных, и соответственно в процессе развития иммунного ответа. Такие молекулы экспрессируются лишь немногими типами клеток, выполняющими функции антигенпредставляющих клеток (АПК), а именно В-лимфоцитами, активированными Т-клетками, макрофагами, дендритными клетками и клетками Лангерганса. Молекулы главного комплекса гистосовместимости III класса являются компонентами системы комплемента и других белков, присутствующих в крови.

Научное обоснование

Ген HLA-DRB1 относится к генам гистосовместимости человека (HLA) II класса, обладает экстремальным полиморфизмом. Известно более 2000 аллелей данного гена, сгруппированных в 13 групп аллелей DRB1 (DRB1*01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15, *16). Генотипирование по локусу DRB1 на уровне групп аллелей (low resolution, низкое разрешение)

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

достаточно для большинства приложений результатов генотипирования, в частности используется для подбора тканесовместимых донора и реципиента при первичных трансплантациях органов, например почек. Показано, что такой уровень генотипирования является достаточным и соответствует стандартам передовых трансплантологических центров мира.

Медицинское обоснование

Трансплантация органов и тканей. Генотипирование по локусам DRB1, DQA1 и DQB1 на уровне групп аллелей используется для подбора тканесовместимых донора и реципиента при первичных трансплантациях органов, для подбора потенциального донора при родственных пересадках гемопоэтических стволовых клеток, а также для первичного скрининга потенциального донора при неродственных пересадках гемопоэтических стволовых клеток.

Аутоиммунные патологии. Риск развития сахарного диабета первого типа, одного из наиболее тяжёлых аутоиммунных заболеваний, существенно (OR=10) возрастает при определении в генотипе любых двух вариантов из числа следующих: DRB1*01, *03, *04, *08, *09, *10. Многочисленные данные мировой литературы указывают на ассоциацию определённых аллельных вариантов генов системы HLA с различными аутоиммунными заболеваниями.

Репродуктивные проблемы. Различие супругов по вариантам генов HLA является одним из важных условий успешного наступления и вынашивания беременности. Сходство супругов между собой по вариантам HLA ведёт к увеличению вероятности появления зародыша с двойным набором одинаковых вариантов генов, то есть HLA-гомозигот, что является неблагоприятным фактором, следствием чего могут быть репродуктивные потери. Поэтому для диагностики причин репродуктивных неудач используют HLA-типирование супругов, чтобы установить сходство между ними по вариантам генов HLA.

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

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов для типирования гена DRB1

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов HLA-ДНК-ТЕХ предназначен для определения специфичностей главного комплекса тканевой совместимости человека на уровне генов методом полимеразной цепной реакции в биологическом материале человека (периферическая кровь) с использованием детектирующих амплификаторов.

Полученные результаты могут быть использованы для подбора гистосовместимого донора при трансплантации органов и тканей, для генетического прогнозирования иммуноопосредованных заболеваний и нарушений репродукции.

1.2 Комплект реагентов для типирования гена DRB1 предназначен для одновременного определения 13 групп аллелей гена DRB1 главного комплекса тканевой совместимости человека.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 Принцип действия

Исследования проводятся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В основе работы комплекта 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 достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления

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

реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в реакционную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку 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 увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

Комплект реагентов для типирования гена DRB1 включает: смеси для амплификации, специфичные для 13 групп аллелей гена DRB1 (DRB1*01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15, *16), а также смесь для амплификации геномной ДНК человека, предназначенную для контроля взятия клинического материала (КВМ). КВМ позволяет определить, достаточно ли ДНК в полученном препарате для исследования. В комплекте реагентов для типирования гена DRB1 используются следующие виды внутренних контрольных образцов:

- в смеси для амплификации пробирок 1,3 – 8 стрипа А и пробирок 1 – 7 стрипа Б добавлен внутренний контрольный образец DRB1 (ВК DRB1), который позволяет программному обеспечению прибора произвести оценку результатов ПЦР в каждой пробирке;
- в смесь для амплификации пробирки 2 стрипа А добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для контроля наличия ДНК;
- в смесь для амплификации пробирки 8 стрипа Б добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

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

Таблица 1 - Состав стрипов, цветовая маркировка и каналы детекции продуктов амплификации

№ пробирки в стрипе	Каналы детекции аллельных вариантов и внутреннего контроля					Цветовая маркировка смеси для амплификации	Цвет парафина
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5		
Стрип А							
1	01	ВК DRB1	-	-	-	Голубая	Белый
2	03	ВК	-	-	-	Бесцветная	
3	04	ВК DRB1	-	-	-		
4	08		Маркер	-	-		
5	09		-	-	-		
6	11		-	-	-		
7	12		-	-	-		
8	13a		-	-	-		
Стрип Б							
1	13b	ВК DRB1	-	-	-	Голубая	Голубой
2	14-1		-	-	-	Бесцветная	
3	14-2		-	-	-		
4	15		-	-	-		
5	16		-	-	-		
6	07		-	-	-		
7	10		-	-	-		
8	КВМ	ВК	Маркер	-	-		

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Исследование с использованием комплекта реагентов для типирования гена DRB1 состоит из этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация в режиме реального времени.

2.2 Комплект реагентов рассчитан на 24 определения, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Состав комплекта

Комплект реагентов для типирования гена DRB1 выпускается в стандартной фасовке (маркируется – фасовка S) и включает следующие компоненты:

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

- смеси для амплификации, запечатанные парафином, стрип А – 24 стрипа по 8 пробирок (по 20 мкл);
- смеси для амплификации, запечатанные парафином, стрип Б – 24 стрипа по 8 пробирок (по 20 мкл);
- раствор Taq-полимеразы – 1 пробирка (4,0 мл);
- минеральное масло – 1 флакон (8,0 мл);
- положительный контрольный образец («К+ DRB1») – 2 пробирки (по 160 мкл).
- крышки для стрипов – 48 шт.

2.4 Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки) – от 2,5 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКТА

3.1 Специфичность анализа

Комплект реагентов для типирования гена DRB1 выявляет следующие группы аллелей гена DRB1: *01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15, *16.

В образцах биологического материала во время проведения амплификации амплификатор должен регистрировать экспоненциальный рост уровня флуоресценции в пробирках, соответствующих имеющимся специфичностям гена DRB1. После завершения реакции амплификации программное обеспечение для приборов ДТлайт[1], ДТпрайм[2] и ДТ-96 определяет генотип исследуемого образца. Интерпретация результатов анализа проводится ПО автоматически.

3.2 Чувствительность анализа

Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку, что соответствует Ср≤32,0, для амплификационной смеси «КВМ» на канале детекции Fam. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу комплекта.

[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

3.3 Диагностическая специфичность составляет 100 (98,7 – 100)%.

4 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.

Выделение ДНК следует проводить в ламинарных шкафах с включённым ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР с использованием комплекта реагентов следует проводить в ПЦР-боксах.

При работе с комплектами реагентов при удалении отходов после амплификации (пробирок содержащих продукты ПЦР) запрещается открытие пробирок, та как это может привести к разбрызгиванию содержимого и контаминации продуктами ПЦР оборудования, реагентов и лабораторной зоны.

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

Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.

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

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

При использовании набора 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».

Не использовать комплект реагентов:

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

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с комплектом реагентов для типирования гена DRB1 требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий (ДТлайт[3], ДТпрайм[4] или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»));
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;

[3] – только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2.
[4] – только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6.

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

- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 2 до 20 мкл, от 2 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл, от 200 до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз, вместимостью 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуются ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА и ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА (ООО «НПО ДНК-Технология»)).

Программное обеспечение для детектирующих амплификаторов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

- версия ПО не ниже 7.5.5.23[5];
- файл с параметрами анализа «HLA.ini» (версия не ниже «HLA_20131111.ini»).

[5] – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/po/

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

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения ДНК из биологического материала.

6.2 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 динатриевой 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.

6.3 Транспортирование и хранение исследуемого материала

Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА и ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА.

Комплект ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА рекомендуется использовать в случае, если предполагается длительное хранение

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

выделенной ДНК (до шести месяцев). ДНК, полученную с использованием комплекта ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА, следует хранить не более одного месяца.

Полученную ДНК также можно использовать для определения генетических полиморфизмов.

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с комплектом для типирования гена DRB1 можно узнать у представителя компании.

Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из периферической крови необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать физиологический раствор в объёме согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК).

7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

7.2.1 Промаркируйте по одному стрипу А и стрипу Б со смесями для амплификации для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца, положительного контрольного образца.

Например, необходимо проанализировать четыре образца. Нужно промаркировать четыре стрипа А и четыре стрипа Б для исследуемых образцов; один стрип А и один стрип Б для «К–»; один стрип А и один стрип Б для «К+». Общее количество стрипов – 12.

7.2.2 Встряхните пробирку с раствором Taq-полимеразы в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Добавьте в каждую пробирку стрипов, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы.

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

7.2.5 Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех стрипов, в

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

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

Внесите в каждую пробирку стрипов для исследуемых образцов, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК.

7.2.6 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего все этапы пробоподготовки, во все пробирки стрипов, маркированных «К–». Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца во все пробирки стрипов, маркированных «К+».

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

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

7.2.9 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «HLA.ini» (7.3). Далее и при последующих постановках добавьте в протокол тест «DRB1» (7.4), укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольного образца, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (7.4.6) и проведите ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Версия ini файла должна быть не ниже «HLA_20131111.ini».

При выборе теста «DRB1» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 2.

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

Таблица 2 - 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	80,0	2	00	1			Цикл
	94,0	5	00				
2	94,0	0	30	5			Цикл
	64,0	0	15		√		
3	94,0	0	10	45			Цикл
	64,0	0	15		√		
4	94,0	0	5	1			Цикл
5	25,0	0	30	1			Цикл
6	25,0	0	15	50	√	1,0 °С	«Кривая плавления», Δt=1 °С; $T_{кон}$=75 °С
7	10,0	…	…	Хранение			Хранение

7.3 Загрузка теста «DRB1» для детектирующих амплификаторов при первой постановке на данном компьютере

ВНИМАНИЕ!

1. Версия теста «DRB1» должна быть не ниже 2.1.
2. Версия ПО не ниже 7.5.5.23[6].

Примечание - Для иллюстраций в настоящей инструкции использованы скриншоты версии 7.9.5.15.

Тест «DRB1» (файл «HLA.ini») для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 предоставляется производителем комплекта. Его установку в программу RealTime_PCR необходимо производить в режиме «Работа с прибором» в следующем порядке:

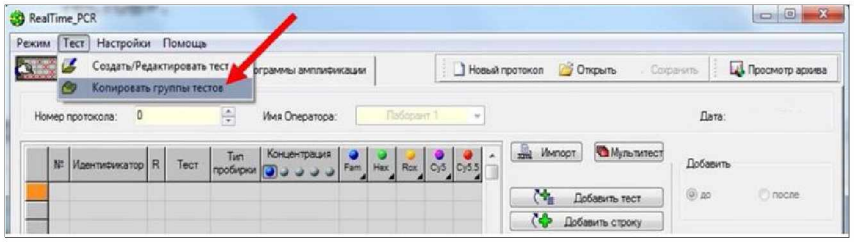
[6] – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/po/

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

7.3.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с комплектом HLA DRB1, выберите режим «Работа с прибором».

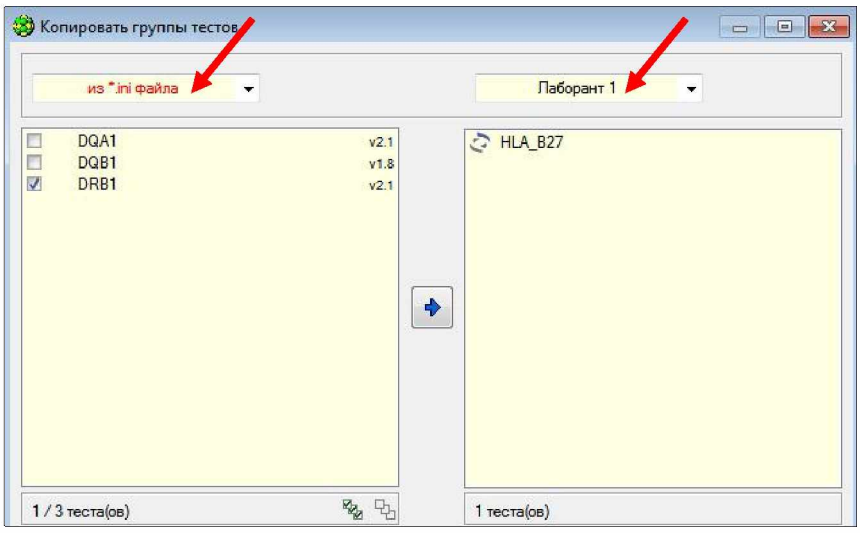
При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.

7.3.2 В меню «Тест» выберите закладку «Копировать группы тестов».



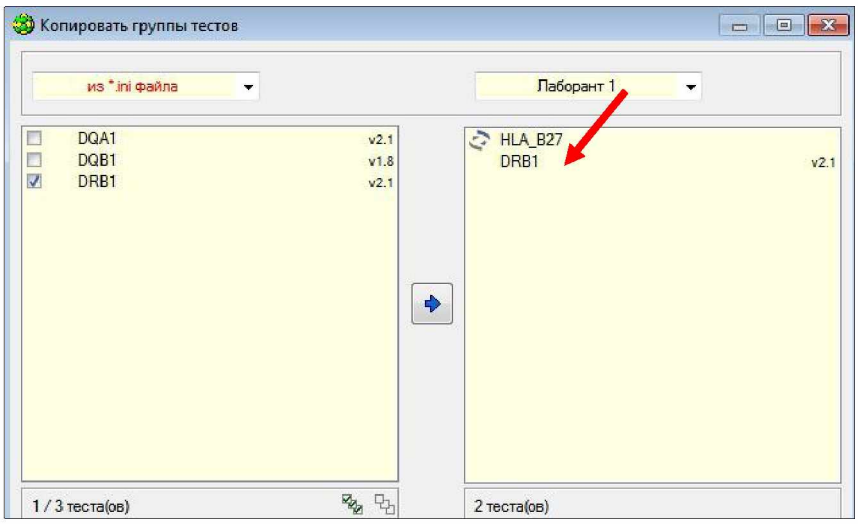
7.3.3 В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл «HLA.ini».

7.3.4 В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которого необходимо скопировать тест «DRB1».



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

7.3.5 Выберите тесты для копирования. Нажмите кнопку , после чего выбранные тесты появятся в правой половине окна.



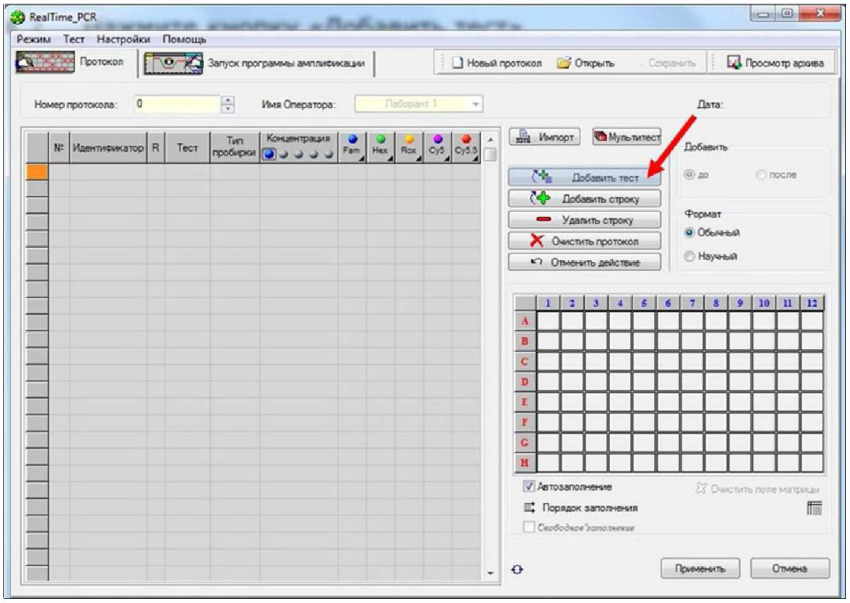
Теперь с тестом «DRB1» может работать оператор, для которого был скопирован тест.

7.4 Ежедневная работа с тестом «DRB1»

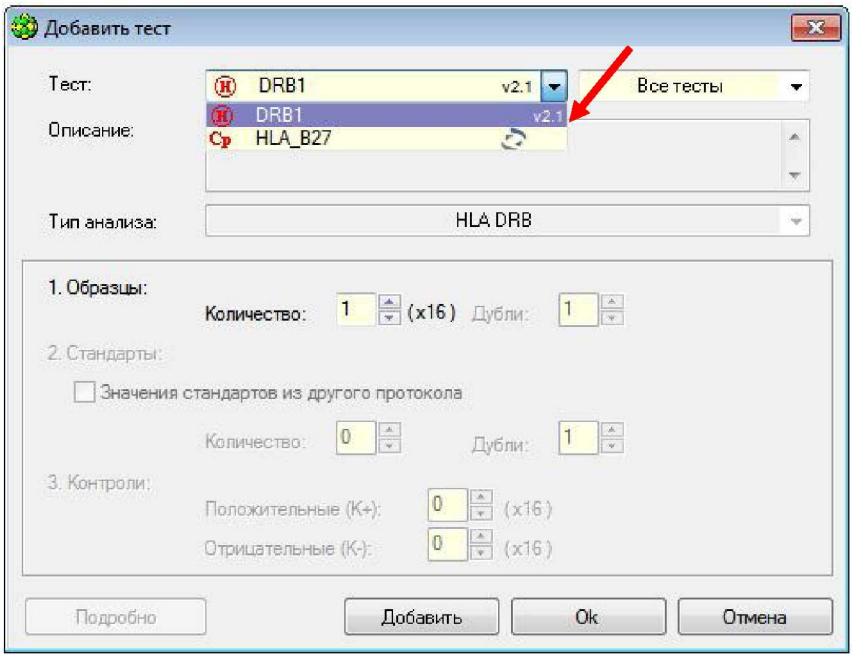
7.4.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, для которого копировали тест (7.3.4), выберите режим «Работа с прибором».

7.4.2 Нажмите кнопку «Добавить тест».

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

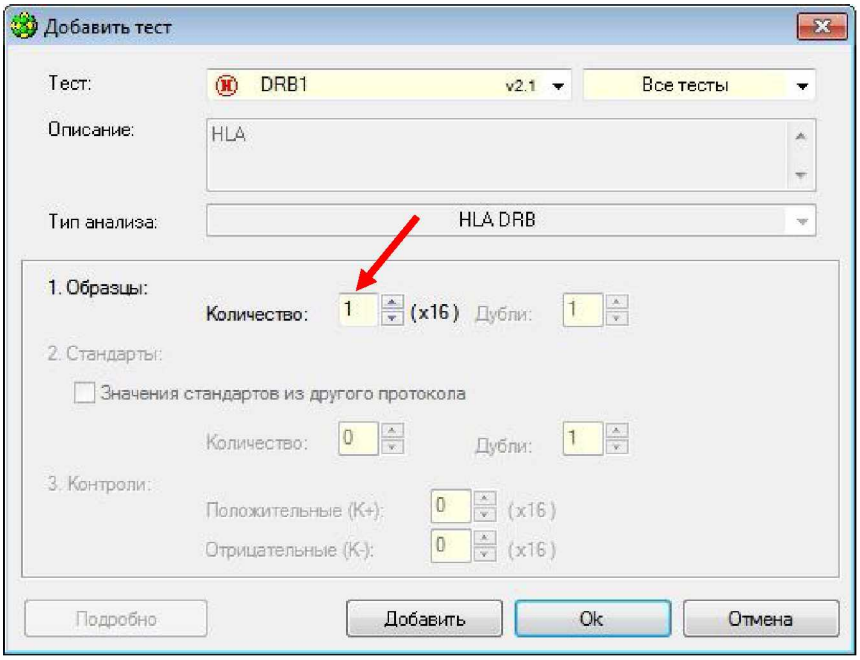


7.4.3 Выберите из списка тест «DRB1».

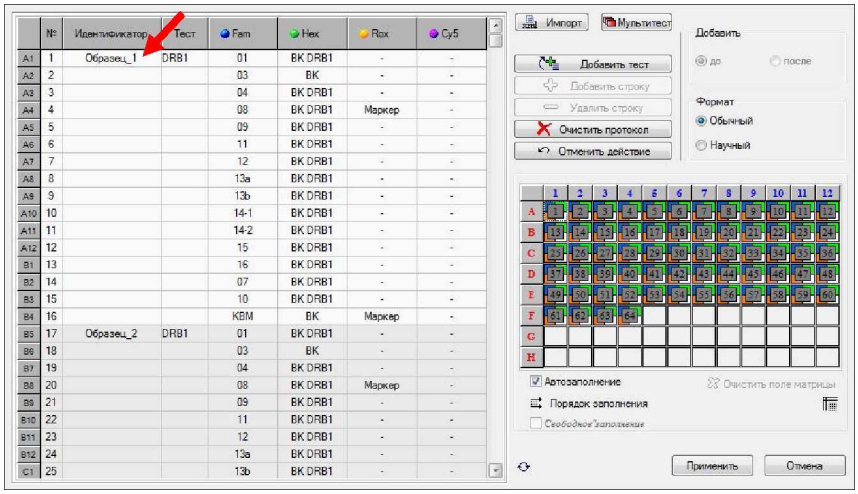


7.4.4 Укажите количество исследуемых образцов (положительные и отрицательные контрольные образцы следует указывать как образцы), нажмите кнопку «Ок».

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

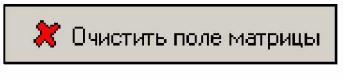


7.4.5 Укажите идентификаторы пробирок.



7.4.6 Отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (при ошибочном заполнении протокола нажмите кнопки «Очистить поле матрицы» -

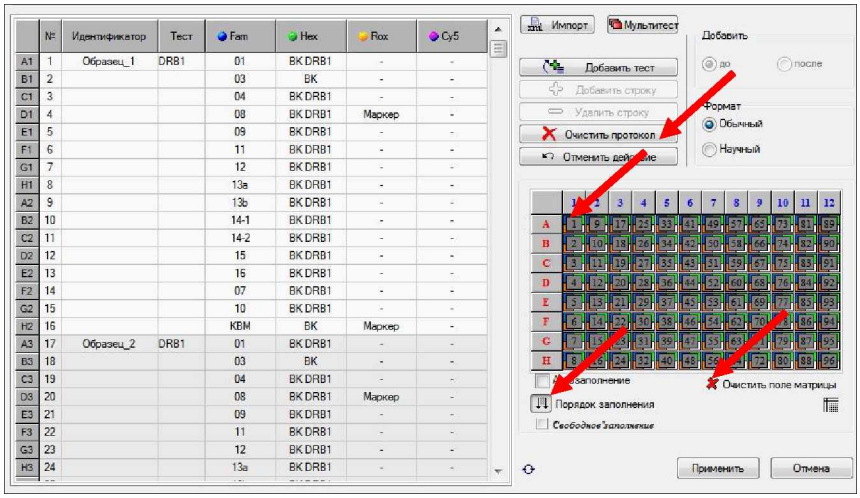
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



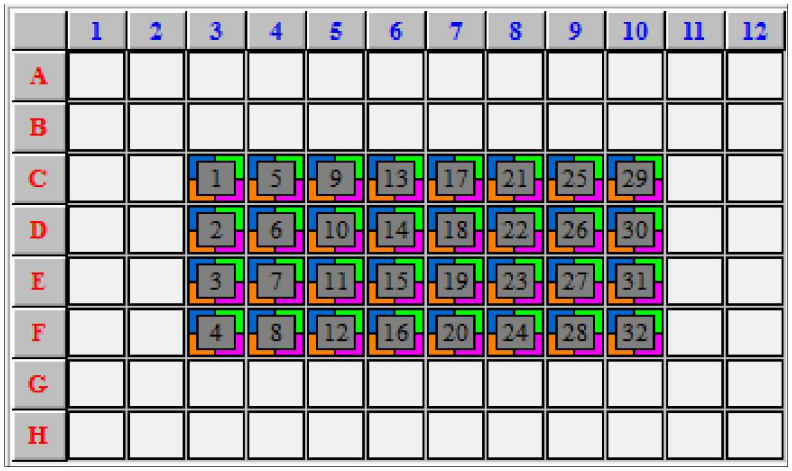
или «Очистить протокол»



и «Порядок заполнения» – ).



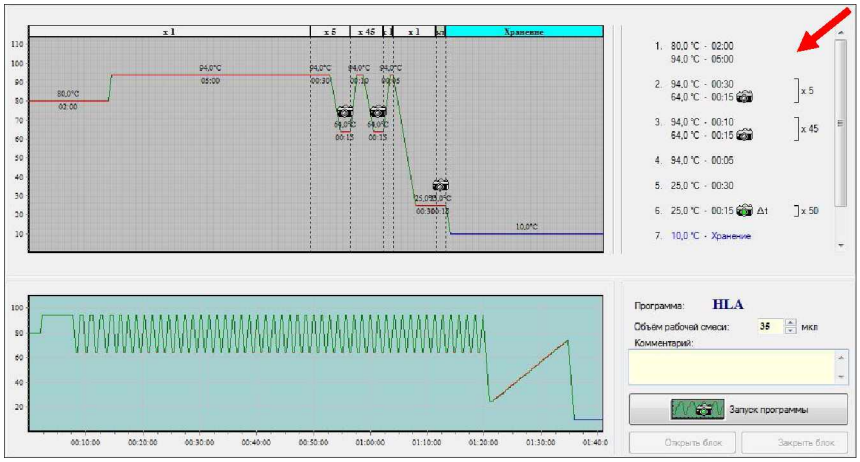
Если термоблок не заполнен полностью, рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой термоблока.



7.4.7 Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол».

7.4.8 В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации «HLA».

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



7.4.9 Нажмите кнопку «Запуск программы» в правом нижнем углу окна.

7.4.10 Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора (7.3.1)).

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

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

После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6 части 1 («Работа с прибором») Руководства по эксплуатации для амплификаторов детектирующих). Анализ проводится программным обеспечением.

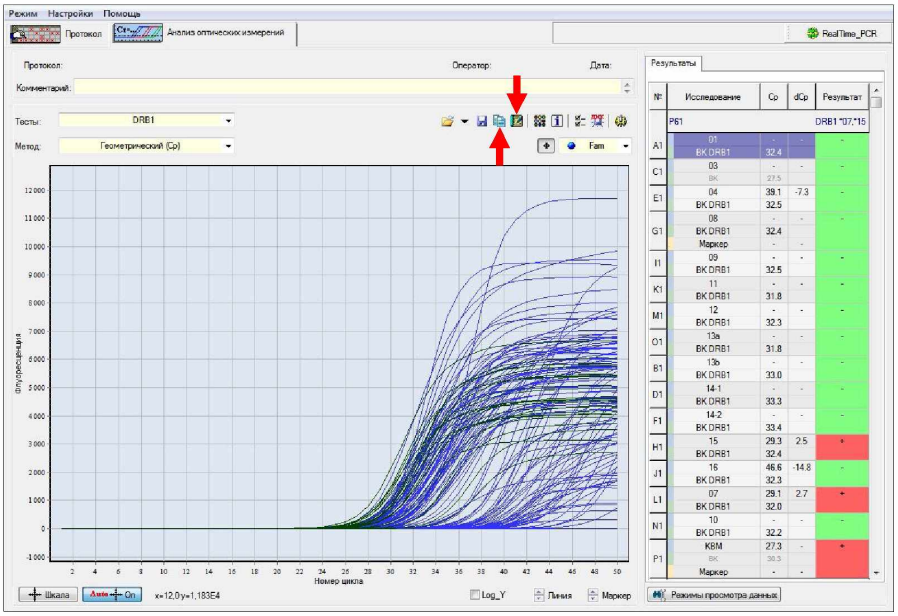
На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторный цикл (Ср) для специфического продукта и ВК DRB1 (КВМ и ВК для пробирки 2 стрипа А и пробирки 8 стрипа Б), dCp, результат по каждому образцу (качественный анализ для каждой пробирки и генотип для образца).

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

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

Для создания лабораторного отчета необходимо нажать кнопку «Отчет» .

Для получения бланка ответа необходимо нажать кнопку «Бланк ответа» .



HLA_DQ, HLA_DRB

Дата
Номер пробирки
Ф.И.О. пациента
Пол
Возраст
Организация
Врач
Примечание

Логотип

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: P61

№	Название исследования	Результаты
1	DRB1	*07,*15

Исследование выполнил:

Дата:
Подпись:

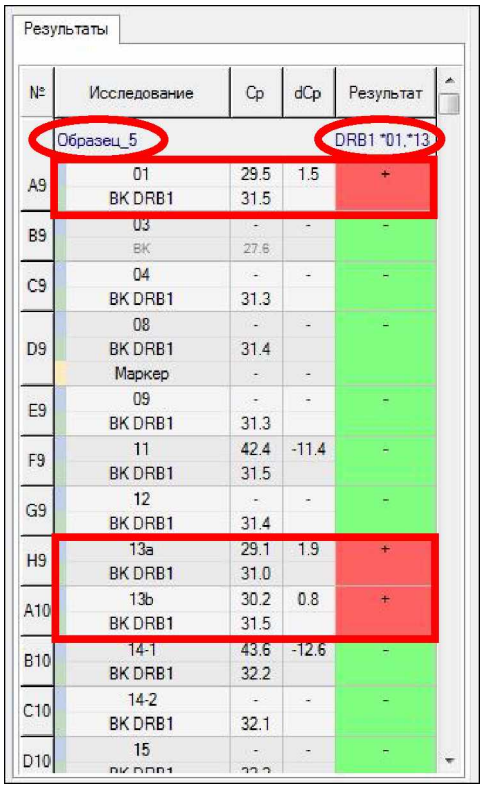
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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

9.2 Специфичности гена HLA DRB1 для каждого образца вычисляются программным обеспечением автоматически с учетом результатов по каждой пробирке для этого образца. При этом у исследуемых образцов может определяться как одна специфичность, так и сочетания специфичностей (Приложение Б, таблица Б1).

9.3 Результат по каждой пробирке данного образца не является генотипом образца. Результат генотипирования указан в верхней графе таблицы справа рядом с идентификатором образца.



На приведённом примере для образца №5 определены специфичности 01, 13a, 13b; итоговый результат генотипирования: DRB1*01, *13.

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

9.4 В случае получения гомозиготного генотипа для достоверности рекомендуется повторить исследование из того же препарата ДНК.

9.5 В случае получения недостоверных или сомнительных результатов генотипирования («?» или «нд») необходимо учитывать значения Ср, полученные для системы контроля взятия материала (КВМ), как указано в таблице 3.

Таблица 3

№ пробирки /стрипа	Результат для КВМ (Ср)	Результат для ВК (Ср)	Интерпретация результата
8/стрип Б	≤ 32,0	Ср указан	ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве
	Более 32,0	Ср указан	ДНК присутствует в недостаточном для анализа количестве

9.6 В случае недостаточного для анализа количества ДНК следует провести повторное выделение ДНК и повторно провести ПЦР для этого образца; также может потребоваться повторное взятие периферической крови.

9.7 В случае, если ДНК для анализа достаточно, возможными причинами недостоверных или сомнительных результатов генотипирования могут быть: присутствие ингибиторов в препарате ДНК, полученном из периферической крови; неверное выполнение протокола анализа; несоблюдение температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР для этого образца, либо повторное взятие клинического материала у пациента (выполняется последовательно).

ВНИМАНИЕ! Если у исследуемого образца определяются специфичности в пробирке 2 стрипа А (*03) и в пробирке 3 стрипа Б (*14-2), а Ср КВМ ≤29, то также будет получен сомнительный результат генотипирования. В этом случае образец необходимо развести в 10 раз и повторно провести ПЦР для этого образца. Для разведения можно использовать элюирующий буфер из комплекта реагентов

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

для выделения ДНК (при использовании для выделения ДНК комплекта ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА допускается разведение образца отрицательным контрольным образцом, прошедшим пробоподготовку).

9.8 Для отрицательных и положительных контрольных образцов должны быть получены результаты, указанные в таблице 4.

Таблица 4

Идентификатор образца	№ пробирки/ стрипа	Результат по специфике	Результат по ВК DRB1/ВК	Результат генотипирования
«К–»	1-8/стрип А 1-7/стрип Б	Ср не указан	Ср не указан	?
	8/стрип Б		Ср указан	
«К+ DRB1»	1-8/стрип А 1-7/стрип Б	Ср указан	Ср указан	
	8/стрип Б		Ср не учитывается	

9.9 При получении для положительного контрольного образца отрицательных значений по каналу Fam результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.10 При получении для отрицательного контрольного образца положительных значений, не указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ КОМПЛЕКТА

10.1 Транспортирование

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

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

Примечание – Допускается транспортирование комплекта реагентов на льду не более 72 часов.

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

10.2 Хранение

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

10.2.2 Смеси для амплификации, запечатанные парафином, следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности комплекта при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

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

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Комплект реагентов должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению комплекта.

10.3.2 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;
- смеси для амплификации, запечатанные парафином, следует хранить в защищенном от света месте в течение всего срока годности комплекта при температуре 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

10.3.3 Комплекты с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 Комплекты с истекшим сроком годности и неиспользованные реактивы утилизируют в соответствии с

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

требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

11.2 Непригодные для использования комплекты реагентов, упаковка комплекта реагентов (пробирки, флаконы, полиэтиленовые пакеты с замком и коробки из картона) относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

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

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

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для типирования гена DRB1, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.6, тел./факс +7 (495) 640-17-71.

Служба клиентской поддержки:
8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).
E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

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

Адрес производителя и место производства:
ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская область, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.

Номер: 209-4
2017-10-05

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

Приложение А
(справочное)

Символы, используемые при маркировке комплекта

	Только для in vitro диагностики
	Температурный диапазон
	Количество определений
	Годен до
	Серия набора
	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

Приложение Б
(справочное)

Таблица Б1 - Интерпретация результатов ПЦР для типирования гена DRB1

№ стрипа	№ пробирки	Смесь	Специфичность гена HLA DRB1														
			*01	*03	*04	*07	*08	*09	*10	*11	*11	*12	*13	*14	*14	*15	*16
А	1	01	+														
	2	03		+													
	3	04			+												
	4	08					+										
	5	09						+									
	6	11								+	+						
	7	12										+					
	8	13a		+									+	+/-	+		
Б	1	13b								+/-			+		+		
	2	14-1									+			+			
	3	14-2		?[1]											+[2]		
	4	15														+	
	5	16															+
	6	07				+											
	7	10							+								

Условные обозначения:

+ - положительно;

+/- - положительно или отрицательно.

[1] – если у исследуемого образца определяются специфичности в пробирке 2 стрипа А (*03) и в пробирке 3 стрипа Б (*14-2), а Ср КВМ ≤29, то будет получен сомнительный результат генотипирования. В этом случае образец необходимо развести в 10 раз и повторно провести ПЦР для этого образца;

[2] – если у исследуемого образца определяются специфичности только в пробирках 13a, 13b, 14-2, то генотип такого образца определяется как *13/14, *14 (т.е. генотип данного образца *13,*14 или *14,*14).

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

ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс +7 (495) 640-17-71
Служба клиентской поддержки:
8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный)
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный)
E-mail: hotline@dna-technology.ru

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