«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«28» 06 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления аллеля HLA-B*27 человека методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест-Генетика HLA-B*27»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления аллеля HLA-B*27 человека методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест-Генетика HLA-B*27» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления аллеля *27 локуса B главного комплекса гистосовместимости человека (HLA-B*27), ассоциированного с риском развития некоторых аутоиммунных заболеваний (серонегативных спондилоартритов), методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических образцов (цельной крови) осуществляется с помощью наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100» (возможно использование других наборов, разрешенных в установленном порядке к обращению в РФ, предназначенных для выделения ДНК из образцов цельной крови).

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами: «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) или «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), зарегистрированными в установленном порядке на территории РФ.

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранных фрагментов ДНК человека – одного, специфичного для аллеля HLA-B*27, и другого, соответствующего аутосомному гену HMBS, общему для всех образцов ДНК человека.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-

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

матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка ДНК человека гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством специфичной ДНК в образце.

Амплификация участка гена HMBS должна детектироваться в каждом образце, что служит контролем присутствия в смеси достаточного количества ДНК человека и контролем правильности проведённых процедур пробоподготовки. Амплификация участка гена HLA-B детектируется только в случае присутствия в генотипе данного индивида аллеля HLA-B*27 и не детектируется в случае его отсутствия, независимо от наличия в генотипе других аллелей локуса HLA-B.

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) *Описание.*	**Количество**
Контрольный образец (КО) *Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)*	1 пробирка, 1 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) *Лиофилизированная*	48 пробирок
Элюирующий раствор «Генетика 2» *Бесцветная жидкость*	2 фл., по 12 мл
Оптическая пленка	1 лист

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления аллеля HLA-B*27 определяется по стандартному образцу предприятия (СОП 05-2-788) и составляет 100 %.

3.2. В КО должна выявляться ДНК маркерных последовательностей аллеля HLA-B*27 и ДНК человека (ген HMBS).

3.3. Диагностическая специфичность выявления аллеля HLA-B*27: клинические испытания, проведенные на 220 образцах, показали 100% специфичность (интервал 98,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

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

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Некоторые компоненты (КО) содержат натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.7. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов

4.8. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.9. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (*такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова», 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен*»).

4.10. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.11. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (с каналами детекции «FAM» и «ROX»):

«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналоги, зарегистрированные в установленном порядке на территории РФ;

– ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», АО «Ламинарные системы, Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– мини-шейкер, обеспечивающий перемешивание реагентов в планшетах с частотой 1200 об/мин (например, PSU-2T, фирма «BioSan», Латвия);

– микроцентрифуга для пробирок вместимостью 2 мл, обеспечивающая 13000 об/мин (например, «Eppendorf MiniSpin», фирма «Eppendorf», Германия);

– встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, фирма «Corning Incorporated-Life Sciences», США);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма SSI, США);

– контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);

– нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Для анализа подготовить клинические образцы (цельной крови) с помощью наборов для выделения ДНК.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содер-

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

жать КО, который является компонентом данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов проводить согласно инструкции набора. Элюцию образцов проводить элюирующим раствором «Генетика 2», который является компонентом данного набора. Пробы готовы к постановке ПЦР-анализа.

6.1.2. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

Выделение ДНК из образцов проводить без добавления внутреннего контрольного образца (ВКО). КО проходит процедуру выделения ДНК аналогично положительному контрольному образцу (ПКО) (см. инструкцию набора для выделения).

Перед выделением ДНК необходимо провести предварительную обработку образцов цельной крови с использованием набора реагентов «РеалБест Гемолитик». Предварительной обработке подвергается цельная кровь объемом 50 мкл согласно инструкции к набору.

Элюцию образцов проводить в 200 мкл элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить 250 мкл элюирующего раствора «Генетика 2», входящего в состав данного набора. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту. Установить пробирки в магнитный штатив.

6.1.3. Выделение ДНК с помощью другого набора реагентов, предусматривающего выделение ДНК из образцов цельной крови, проводить в соответствии с инструкцией по его применению. Затем к полученному элюату добавить 400 мкл элюирующего раствора «Генетика 2», входящего в состав данного набора.

6.1.3. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-26) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая КО) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Неиспользованные пробирки с ГРС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки ГРС хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

КО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

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

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК и детекции флуоресцентных сигналов.

Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору и пп. 7.6.-7.9.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

— 1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд)

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.7. Выбрать каналы для детекции амплификации соответствующих участков ДНК человека:

«FAM» – регистрация сигнала при амплификации фрагмента гена HMBS;

«ROX» – регистрация сигнала при амплификации специфичного для аллеля HLA-B*27 фрагмента ДНК.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольным образцом согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

8.1.1. В КО должно фиксироваться:

- нарастание сигнала амплификации ДНК HMBS (канал «FAM») и определяться значение порогового цикла Ct HMBS меньше или равно 28;

- нарастание сигнала специфичного для аллеля HLA-B*27 продукта амплификации (канал «ROX») и определяться значение порогового цикла Ct HLA-B*27 меньше или равно 35.

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

8.2. Валидация образца.

8.2.1. Для каждого исследуемого образца должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации ДНК гена HMBS человека (канал «FAM») и определяться значение порогового цикла Ct HMBS.

8.2.2. Анализируемый образец считается валидным, если для этого образца Ct по каналу «FAM» меньше или равно 28.

8.2.3. Для образцов, признанных не валидными (Ct по каналу «FAM» больше 28), необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

Внимание! Анализ исследуемого образца считается действительным только в том случае, если образец признан валидным.

8.3. Анализ результатов выявления аллеля HLA-B*27.

8.3.1. Для исследуемых образцов, признанных валидными по п. 8.2, в которых фиксируется нарастание сигнала амплификации ДНК HLA-B*27 (канал «ROX») и определяется значение порогового цикла Ct HLA-B*27, рассчитать ΔCt, где

ΔCt = Ct HLA-B*27 – Ct HMBS

8.3.2. Анализируемый образец учитывается как положительный, то есть содержащий аллель HLA-B*27, если для этого образца значение ΔCt меньше или равно 7.

8.3.3. Анализируемый образец учитывается как отрицательный, то есть не содержащий аллель HLA-B*27, если для этого образца значение ΔCt больше 7 или не фиксируется нарастание сигнала амплификации ДНК HLA-B*27 и не определяется значение порогового цикла Ct HLA-B*27.

8.4. Диагностическая значимость выявления аллеля HLA-B*27.

Локус HLA-B кодирует присутствующий на поверхности всех клеток в организме антиген, относящийся к молекулам главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса I. Основная функция MHC класса I - представление на поверхность фрагментов белков, присутствующих внутри клетки. Если иммунная система распознаёт эти пептиды как чужеродные (бактериальные или вирусные), то заражённая клетка подлежит уничтожению. Существуют сотни аллельных вариантов гена HLA-B. Группа аллелей B*27 кодирует вариант антигена, который способен участвовать в аутоиммунном процессе, направленном против собственных тканей организма, богатых коллагеном или протеогликанами. Аутоиммунный процесс обычно возникает не спонтанно, а запускается бактериальной инфекцией.

Наличие аллеля HLA-B*27 в генотипе индивида не означает обязательного развития патологий. Антиген HLA-B27 встречается у 7-8% людей в популяциях европеоидов и у 1-6% у азиатов, при этом никаких негативных симптомов у большинства носителей HLA-B*27 не наблюдается. Однако, частота встречаемости аллеля HLA-B*27 резко увеличивается у боль-

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

ных анкилозирующим спондилоартритом (болезнь Бехтерева), при реактивных (вторичных) артритах, болезни (синдроме) Рейтера, псориатическом артрите, энтеропатических артритах, при передних эндогенных увеитах.

Точные молекулярные и патогенетические механизмы связи HLA-B27 и ассоциированных с ним воспалительных заболеваний остаются недостаточно ясными. Подавляющее большинство людей, которые являются носителями HLA-B27 антигена, здоровы, хотя риск развития ревматоидных заболеваний выше, чем у HLA-B27-негативных индивидов. Проявления чаще встречаются у мужчин, чем у женщин. Существуют эпидемиологические, клинические и экспериментальные доказательства патогенетической роли бактериальных агентов, таких как *Chlamidia trachomatis* и грамотрицательных бактерий (*Klebsiella, Salmonella, Yersinia, Shigella* и *Campylobacter*). Микробные антигены могут провоцировать развитие аутоиммунных процессов через механизм молекулярной мимикрии между HLA-B27 антигеном и липополисахаридом бактериальной клетки. Ввиду повышенного риска развития воспалительных болезней суставов носителям аллеля HLA-B27 следует особо уделять внимание профилактике и своевременному лечению бактериальных кишечных инфекций и инфекций мочеполового тракта (особенно хламидиоза).

Более подробно ознакомиться с диагностической значимостью выявления аллеля HLA-B*27 человека можно в литературе:

1. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Геномика HLA: новые возможности молекулярной генетики человека в диагностике и терапии // Молек. Мед. - 2003. - № 1. - С. 17-31.

2. Эрдес Ш., Гусева И.А., Беневоленская Л.И. Взаимосвязь анкилозирующего спондилоартрита и HLA-B27 в некоторых этнических группах России // Тер. архив. – 2001. - № 1. - С. 27-31.

3. Эрдес Ш., Гусев И.А., Крылов М.Ю., Беневоленская Л.И. Спондилоартропатия и субтипы HLA-B27 в некоторых популяциях севера России // Тер. арх. - 1997. - № 5. - с. 41-43.

4. Bowness P. HLA B27 in health and disease: a double-edged sword? // Rheumatology-(Oxford). - 2002. - Vol. 41. - № 8. - P. 857-868.

5. Colmegna I., Cuchacovich R., Espinoza LR. HLA-B27-associated reactive arthritis: pathogenetic and clinical considerations. // Clin. Microbiol. Rev. - 2004. - V. 17. - P. 348 - 369.

6. Khan M.A. HLA-B27 polymorphism and association with disease // J. Rheumatol. - 2000. - V. 27. - P. 1110-1114.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспорт-

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

ных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика HLA-B*27», следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211, тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

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