Организация-производитель

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «ДНК-Технология ТС»

_____ С.П. Левичев

«26» января 2017 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НПФ ДНК-Технология»

_____ Д.Ю. Трофимов

«26» января 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выявления аллеля 27 локуса B главного комплекса гистосовместимости человека методом ПЦР в режиме реального времени

HLA-B27

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

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ ОГРН 1057746343870
«ДНК-Технология ТС»
«DNA-Technology TS»
LLC
МОСКВА

2017 г.

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

ВВЕДЕНИЕ

HLA-B27 является одним из вариантов молекул главного комплекса тканевой совместимости человека (HLA) I класса, локуса B. Комплекс генов HLA (Human Leukocyte Antigens, антигены лейкоцитов человека) расположен на коротком плече 6-ой хромосомы, включает несколько десятков генов, обеспечивающих функцию иммунного ответа.

Белковые продукты генов HLA I класса (антигены) играют ключевую роль в поддержании генетического постоянства тканей организма и обеспечении устойчивости человека к инфекциям, преимущественно вирусным.

В некоторых случаях, в силу ряда причин (например, при генетической предрасположенности, снижении способности иммунной системы к обратной регуляции иммунных реакций), нормальный иммунный ответ на некоторые микроорганизмы становится патологическим, аутоиммунным. Аутоиммунный ответ направлен против собственных нормальных тканей организма, вызывает их повреждение и развитие аутоиммунного воспаления.

Ярким примером, демонстрирующим связь генов HLA с развитием заболеваний, является HLA-B27, вариант гена HLA в локусе B. Установлено, что эта молекула является «маркером» целого ряда воспалительных заболеваний суставов, которые были объединены в группу серонегативных спондилоартритов (ССА).

Заболевания, включенные в группу ССА, имеют общие патогенетические механизмы и ряд сходных клинико-рентгенологических признаков:

- серонегативность по ревматоидному фактору (РФ),
- поражение крестцово-подвздошных сочленений и позвоночника,
- асимметричный артрит с преимущественным поражением суставов нижних конечностей,
- семейная предрасположенность к развитию заболеваний,
- тенденция к «клиническим перекрестам» ("overlap syndrom") заболеваний, входящих в группу.

Особенностью ССА является поражение не только опорно-двигательного аппарата, но и других органов и систем: глаз, кожи, слизистых, сердца, аорты, почек. Многообразие внесуставных проявлений отражает клинический полиморфизм ССА и характеризует их как заболевания с системным типом воспаления, при которых

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

патология суставов и позвоночника может в разное время выступать в различных сочетаниях с поражением других органов.

В группу ССА входят следующие заболевания:

- Идиопатический анкилозирующий спондилоартрит (болезнь Бехтерева),
- Псориатический артрит,
- Реактивные артриты (Синдром Рейтера),
- Энтеропатические артриты (при болезнях Крона, Уиппла, неспецифическом язвенном колите),
- Острый передний увеит,
- Ювенильный спондилоартрит,
- Недифференцированные артропатии.

Ассоциация анкилозирующего спондилита (болезнь Бехтерева) с HLA-B27 является примером одной из наиболее сильных генетических связей комплекса генов HLA с болезнями в области ревматологии. Эта генетическая связь была открыта в начале 70-х годов, когда было обнаружено, что 90-95% пациентов с анкилозирующим спондилитом имели HLA-B27, в то время как частота этого гена в общей популяции составляет 8-10%.

В настоящее время установлено, что другие болезни из группы ССА имеют различные, но более низкие, чем для анкилозирующего спондилита, ассоциации с HLA-B27. Частота встречаемости HLA B27 у детей с ювенильным спондилоартритом составляет 80-90%, у больных с реактивным артритом 60-90%, у больных с недифференцированными артропатиями 50-70%, у пациентов с псориатическим артритом и энтеропатическим артритом 50-60%. При этом частота встречаемости HLA-B27 у пациентов с энтеропатическими артритами при наличии периферическиих артритов практически не отличается от общепопуляционной частоты. Увеличение частоты встречаемости HLA B27 наблюдается только у пациентов при наличии спондилита/сакроилеита.

Выявление маркера HLA-B27 в комплексе с другими лабораторными и рентгенологическими исследованиями существенно повышает возможности постановки правильного диагноза и прогноза заболеваний, относящихся к группе серонегативных спондилоартритов, однако окончательный диагноз может поставить только врач ревматолог на основании всей совокупности клинико-рентгено-лабораторно-анамнестических данных.

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

Показанием к назначению анализа является:

1. Наличие клинических симптомов спондилоартропатий: воспалительные боли в спине, асимметричные периферические олигоартриты, преимущественно нижних конечностей, энтезиты и/или тендосиновииты.

2. Как дополнительный лабораторный показатель с целью прогноза тяжести течения спондилоартропатий.

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

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Настоящая инструкция распространяется набор реагентов для выявления аллеля 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека методом ПЦР в режиме реального времени (HLA-B27).

1.2 Набор реагентов HLA-B27 предназначен для выявления аллеля 27 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в биологическом материале человека (периферическая кровь) с использованием детектирующих амплификаторов.

Выявление HLA-B27 позволяет определить предрасположенность к развитию анкилозирующего спондилита (болезнь Бехтерева) и ревматоидного артрита.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Состав набора

Набор реагентов HLA-B27 выпускается в следующих фасовках: стандартная (маркируется – фасовка S), универсальная (маркируется – фасовка U).

В состав набора реагентов входят следующие компоненты:

а) Фасовка S, REF R1-H004-23/4 (пробирки);
REF R1-H004-S3/4 (стрипы).

- Смесь для амплификации, запечатанная парафином – 48 пробирок или 6 стрипов по 8 пробирок (по 20 мкл);
- Раствор Taq-полимеразы – 1 пробирка (500 мкл);
- Минеральное масло – 1 пробирка (1,0 мл);
- Положительный контрольный образец – 1 пробирка (75 мкл).
- Крышки для стрипов – 6 шт. (при расфасовке в стрипы смеси для амплификации, запечатанной парафином).

б) Фасовка U, REF R1-H004-N3/4

- Смесь для амплификации – 1 пробирка (960 мкл);
- ПЦР-буфер – 1 пробирка (500 мкл);

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

- Полимераза ТехноTaq MAX – 1 пробирка (24 мкл);
- Минеральное масло – 1 пробирка (1,0 мл);
- Положительный контрольный образец – 1 пробирка (75 мкл).

2.2 Число анализируемых проб

Набор реагентов стандартной и универсальной фасовки рассчитан на 48 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода исследования

Метод: Полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный анализ.

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

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего старта», который обеспечивается методикой приготовления 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 смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического 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.

Набор реагентов включает смесь для амплификации специфичную для аллеля HLA-B27 и внутреннего контроля. В качестве внутреннего контроля используется

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

контроль взятия материала для системы HLA-B27. Использование внутреннего контроля позволяет избежать ложноотрицательных результатов в случае недостаточного для анализа количества геномной ДНК человека в образце.

В состав ДНК-зондов, использующего для детекции продукта амплификации HLA-B27, включена флуоресцентная метки Fam. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации внутреннего контроля, входит флуоресцентный краситель Hex.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке. В таблице 1 представлены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
HLA-B27	ВК B27	-	-	-

Исследование с использованием набора реагентов состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация ДНК в режиме реального времени. Для проведения ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени используют амплификаторы детектирующие (ООО «НПО ДНК-Технология») ДТлайт[1], ДТпрайм[2] и ДТ-96.

Время проведения анализа (без учета пробоподготовки): от 1,5 ч.

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

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1 Специфичность анализа

В образцах биологического материала человека, содержащих аллель HLA-B27 в гомозиготном или в гетерозиготном состоянии, регистрируется положительный результат по каналам Fam и Hex, при условии Ср Hex ≤ 32 и ΔCp = Cp (Fam) – Cp (Hex) менее 8,0.

Для образцов биологического материала человека, не содержащих аллель HLA-B27, регистрируется либо отрицательный результат по каналу Fam и положительный по каналу Hex (Ср Hex ≤ 32), либо положительный результат по каналам Fam и Hex, при условии Ср Hex ≤ 32 и ΔCp = Cp (Fam) – Cp (Hex) более 10,0.

3.2 Чувствительность анализа

Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку.

При использовании меньшего количества ДНК (Ср>32,0 на канале детекции ВК (Hex) производитель не гарантирует корректную работу набора.

Примечание - Количество не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку соответствует Ср≤32,0 на канале детекции ВК (Hex).

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

3.3 Диагностические характеристики

Количество образцов	N=150
Аналитическая чувствительность (95% ДИ)	100% (94,1-100%)
Аналитическая специфичность (95% ДИ)	100% (95,9-100%)
Диагностическая чувствительность (95% ДИ)	100% (92,9-100%)
Диагностическая специфичность (95% ДИ)	89% (81,2-94,4%)

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

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

Подготовку и проведение исследования с использованием набора реагентов следует проводить в ПЦР-боксах.

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

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение одного часа.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

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 набор реагентов:

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

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

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

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- детектирующий амплификатор: ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96;
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой;
- пробирки амплификационные или стрипы с крышками объёмом 0,2 мл;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или стрипованных пробирок объемом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объема одноканальные позволяющие отбирать объемы жидкости от 2 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от ДНКаз и РНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- физиологический раствор (0,9 % NaCl) стерильный;
- комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА или ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА производства ООО «НПО ДНК-Технология»).
- программное обеспечение для амплификаторов детектирующих ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:
- версия ПО не ниже 7.5.5.23[3];
- ini файл "HLA_B27.ini" с параметрами анализа.

[3]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

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 для выделения ДНК из биологического материала.

Взятие периферической крови

Взятие периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объемом 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.

6.2 Транспортировка и хранение исследуемого материала

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

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

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

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

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с набором реагентов HLA-B27 можно узнать у представителя компании.

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

7.2 Подготовка и проведение ПЦР

7.2.1 Подготовка и проведение ПЦР (фасовка S)

7.2.1.1 Промаркируйте по одной пробирке со смесью для амплификации для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца и положительного контрольного образца.

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

7.2.1.3 Внесите в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы.

7.2.1.4 Далее выполните пункты 7.2.3 – 7.2.9.

7.2.2 Подготовка и проведение ПЦР (фасовка U)

7.2.2.1 Промаркируйте необходимое количество пробирок для амплификации объёмом 0,2 мл (по одной для каждого исследуемого образца, одну для положительного контрольного образца, одну для отрицательного контрольного образца).

7.2.2.2 Встряхните пробирку со смесью для амплификации в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

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

7.2.2.3 Внесите в промаркированные пробирки по 20 мкл смеси для амплификации.

7.2.2.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

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

7.2.2.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq МАХ.

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

Смешайте в отдельной пробирке:

10 х (N+1) мкл ПЦР-буфера,

0,5 х (N+1) мкл полимеразы ТехноТаq МАХ,

где N – количество промаркированных пробирок с учётом К+ и К-.

Например, необходимо проанализировать пять образцов.

Промаркируйте семь пробирок (пять для исследуемых образцов, одна для К+, одна для К-). Приготовьте смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ для восьми (7+1) пробирок, т.е. 80 мкл ПЦР-буфера плюс 4,0 мкл полимеразы ТехноТаq МАХ.

7.2.2.6 Встряхните пробирку с полученной смесью в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

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

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ в пробирки со смесями для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить пункты 7.2.3 – 7.2.9.

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

7.2.4 Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить

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

наконечниками с фильтром.

Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов.

7.2.5 Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца в пробирку маркированную «К+».

7.2.6 Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК, в пробирку, маркированную «К-».

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

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

7.2.9 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, выберите режим «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini файл "HLA_B27.ini". При последующих постановках добавьте в протокол тест "HLA_B27", укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. п. 7.2.9) и проведите ПЦР. При выборе теста "HLA_B27" в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 4.

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов ДТлайт[1], ДТпрайм[2] и ДТ-96

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	10	…	…	хранение		хранение

[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

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов необходимо уточнить программу амплификации у представителя компании.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

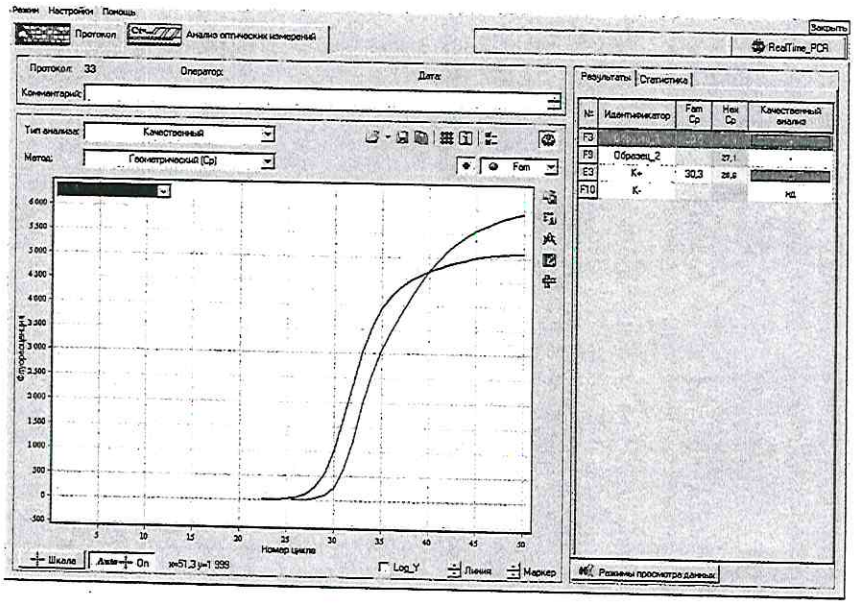
8.1 Регистрация результатов ПЦР осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

8.2 Детекция и учет результатов осуществляется амплификатором детектирующим автоматически.

8.3 Анализ проводится программным обеспечением.

На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан индентификатор образца и индикаторный цикл (Ср).

Пример выдачи результатов прибором:



9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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

9.2 Интерпретация результатов для каждого образца проводится с учётом значений Ср по каналу специфики (канал Fam) и внутреннего контроля (канал Hex) в соответствии с таблицей 5.

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

Таблица 5 – Вычисления и интерпретации результатов исследования

Результат по каналу Fam Cp (Fam)	Результат по каналу Hex Cp (Hex)	ΔCp = Cp (Fam) - Cp (Hex)	Интерпретация результата
Cp указан	Cp ≤32,0*	менее 8,0	аллель HLA-B27 обнаружен
Cp указан	Cp ≤32,0	более 10,0	аллель HLA-B27 не обнаружен
Cp не указан	Cp ≤32,0	не учитывается	
Cp указан	Cp ≤32,0	8,0 – 10,0	результат сомнительный
Cp указан/ не указан	Cp не указан	не учитывается	результат недостоверный
	Cp > 32,0	не учитывается	

* соответствует количеству анализируемой ДНК более 1,0 нг на амплификационную пробирку

9.3 В случае получения сомнительного результата необходимо повторить проведение полимеразной цепной реакции для данного образца. При повторном получении такого же результата следует повторить пробоподготовку и проведение ПЦР для данного образца.

Если ДНК получена при использовании комплекта реагентов для выделения ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА и значение ΔCp = Cp (Fam) - Cp (Hex) укладывается в пределы от 8,0 до 10,0 следует развести полученный препарат ДНК в 10 раз стерильной дистиллированной водой. При этом необходимо учесть, что показание «Cp Hex» изменится. В данном случае для образца достоверным необходимо считать только тот результат, для которого Cp Hex < 35,0.

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

Недостоверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др.

9.5 В положительном контрольном образце должен определяться аллель HLA-B27. При получении отрицательного или недостоверного результата для положительного контрольного образца результаты всей постановочной серии

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

считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.6 Для отрицательного контрольного образца должен быть зафиксирован недостоверный результат. При получении других значений результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

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

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

10.2 Хранение

10.2.1 Компоненты набора (за исключением полимеразы ТехноТаq MAX) следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора. Полимеразу ТехноТаq MAX - при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора. Смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора.

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

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

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

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

- компоненты набора (за исключением полимеразы ТехноТаq МАХ) следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора;

- смеси для амплификации следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора;

- полимеразу ТехноТаq МАХ - при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.

10.3.3 Наборы с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 Наборы 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 наборы реагентов, упаковка набора реагентов (пробирки, флаконы, полиэтиленовые пакеты с замком и коробки из картона) относится к отходам класса А и утилизируются с бытовыми отходами.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

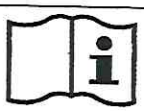
12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

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

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

Приложение А

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

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов HLA-B27, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:
ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, к.6. тел./факс (495) 640-17-71 www.dna-technology.ru
Служба клиентской поддержки: 8 (800) 200-75-15 (звонок по России бесплатный),
E-mail: hotline@dna-technology.ru
Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/customer_support/

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

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

Ведущий научный сотрудник
ООО «НПФ ДНК-Технология»,
кандидат биологических наук — Е.В. Гончарова
«26» 01 2017 г.

СОГЛАСОВАНО
Директор ФГБУН КНИИГ и
ПК ФМБА России — И.В. Парамонов
«26» 01 2017 г.

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