



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

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 аутомсомной 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)

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 DOB1 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.

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

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 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.

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.

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	BK DRB1	-	-	-	Голубая	Белый
2	03	BK	-	-	-	Бесцветная	
3	04	BK DRB1	-	-	-		
4	08		Маркер	-	-		
5	09		-	-	-		
6	11		-	-	-		
7	12		-	-	-		
8	13a		-	-	-		
Стрип Б							
1	13b	BK DRB1	-	-	-	Голубая	Голубой
2	14-1		-	-	-	Бесцветная	
3	14-2		-	-	-		
4	15		-	-	-		
5	16		-	-	-		
6	07		-	-	-		
7	10		-	-	-		
8	KBM	BK	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:

- 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 («K+ 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 ДТлайт¹, ДТпрайм² 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 $C_p \leq 32,0$, для амплификационной смеси «КВМ» на канале детекции Fam. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу комплекта.

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

¹ – только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2.

² – только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6.

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 клиничко-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, так 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.

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 (ДТлайт³, ДТпрайм⁴ или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»));
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;

³ – только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2.

⁴ – только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6.

- 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 7.5.5.23⁵;
- 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/>

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 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.

6.3 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. Рекомендуются 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 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 Таq-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 Таq-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 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 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 «DRB1» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 2.

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 7.5.5.23⁶.

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

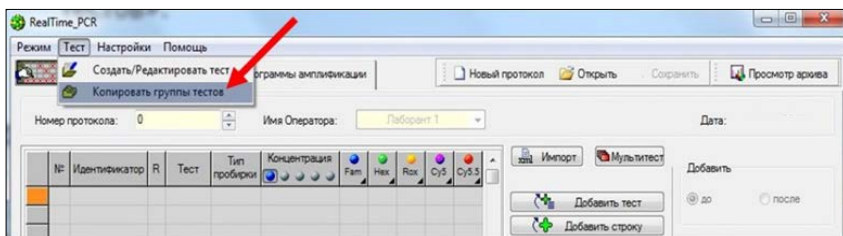
Тест «DRB1» (файл «HLA.ini») для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 предоставляется производителем комплекта. Его установку в программу RealTime_PCR необходимо производить в режиме «Работа с прибором» в следующем порядке:

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/>

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

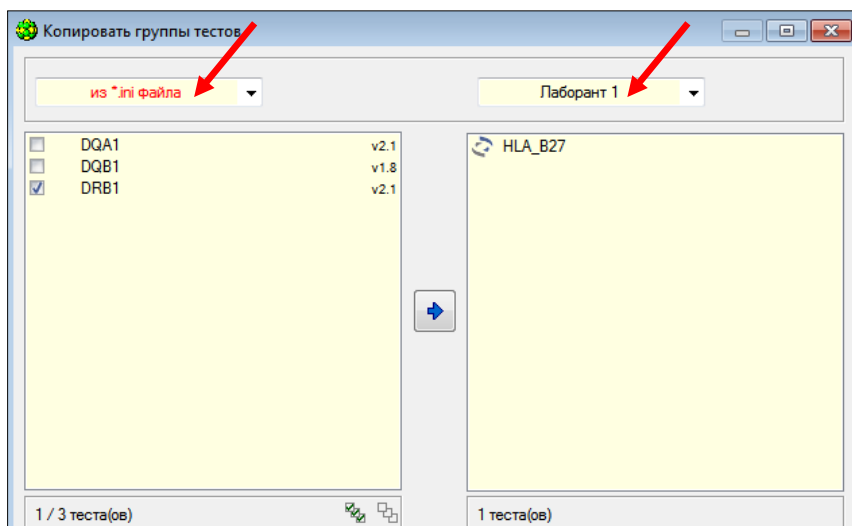
При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.


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

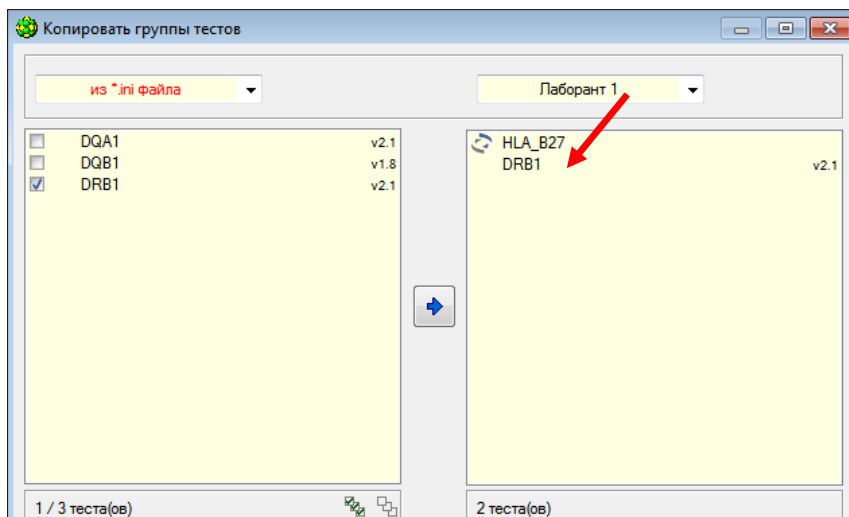


- 7.3.3 В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл «HLA.ini».

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



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

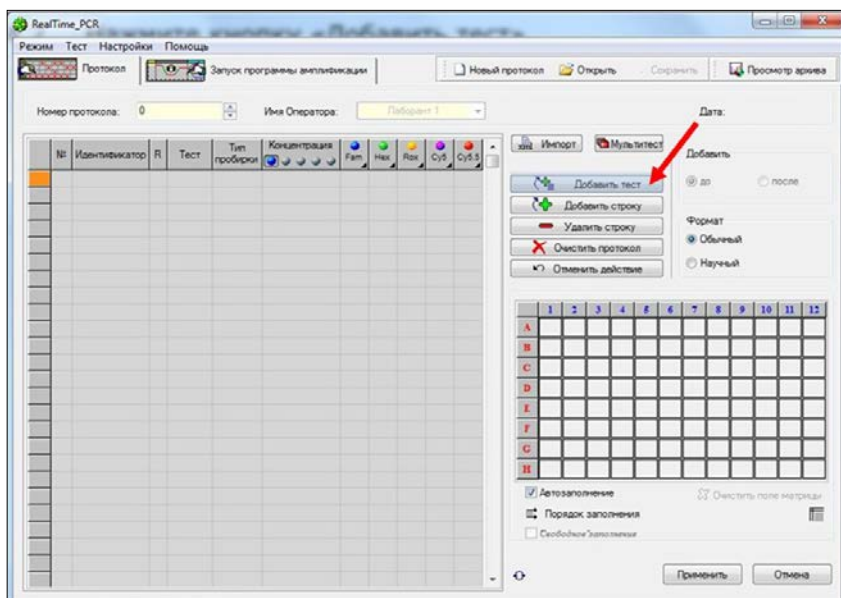


Теперь с тестом «DRB1» может работать оператор, для которого был скопирован тест.

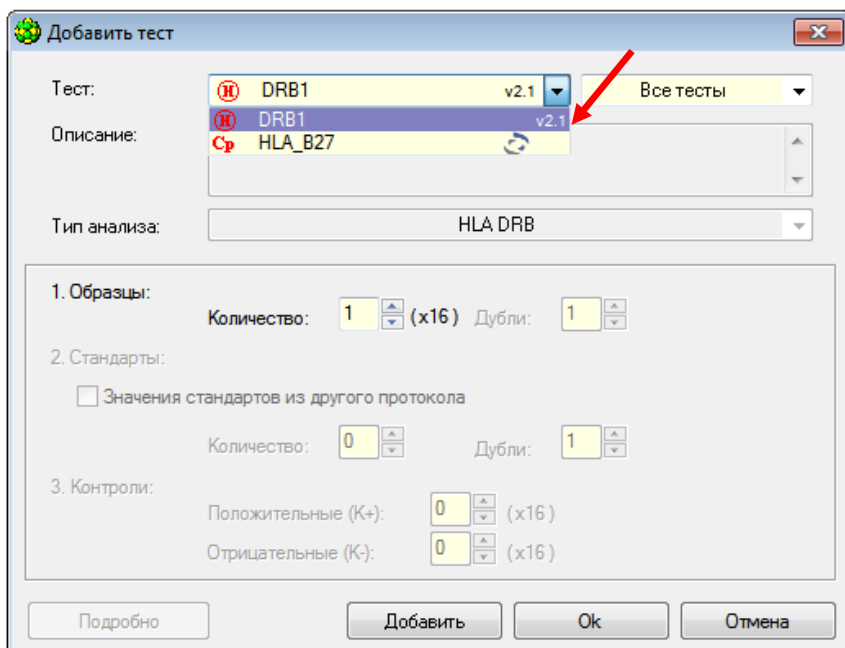
7.4 Ежедневная работа с тестом «DRB1»

- 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».



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».

Добавить тест

Тест: DRB1 v.2.1 Все тесты

Описание: HLA

Тип анализа: HLA DRB

1. Образцы: Количество: 1 (x16) Дубли: 1

2. Стандарты: Значения стандартов из другого протокола
Количество: 0 Дубли: 1

3. Контроли: Положительные (К+): 0 (x16)
Отрицательные (К-): 0 (x16)

Подробно Добавить Ок Отмена

7.4.5 Укажите идентификаторы пробирок.

№	Идентификатор	Тест	Fap	Hex	Rox	Cy5
A1	1	Образец_1	DRB1	01	BK DRB1	-
A2	2			03	BK	-
A3	3			04	BK DRB1	-
A4	4			08	BK DRB1	Маркер
A5	5			09	BK DRB1	-
A6	6			11	BK DRB1	-
A7	7			12	BK DRB1	-
A8	8			13a	BK DRB1	-
A9	9			13b	BK DRB1	-
A10	10			14-1	BK DRB1	-
A11	11			14-2	BK DRB1	-
A12	12			15	BK DRB1	-
B1	13			16	BK DRB1	-
B2	14			07	BK DRB1	-
B3	15			10	BK DRB1	-
B4	16			KBM	BK	Маркер
B5	17	Образец_2	DRB1	01	BK DRB1	-
B6	18			03	BK	-
B7	19			04	BK DRB1	-
B8	20			08	BK DRB1	Маркер
B9	21			09	BK DRB1	-
B10	22			11	BK DRB1	-
B11	23			12	BK DRB1	-
B12	24			13a	BK DRB1	-
B1	25			13b	BK DRB1	-

Импорт Мультитест

Добавить до после

Добавить тест
Добавить строку
Удалить строку
Очистить протокол
Отменить действие

Формат: Обычный Научный

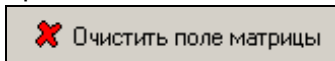
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64								
G												
H												

Автозаполнение Очистить поле матрицы

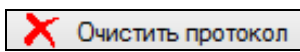
Порядок заполнения Свободное заполнение

Применить Отмена

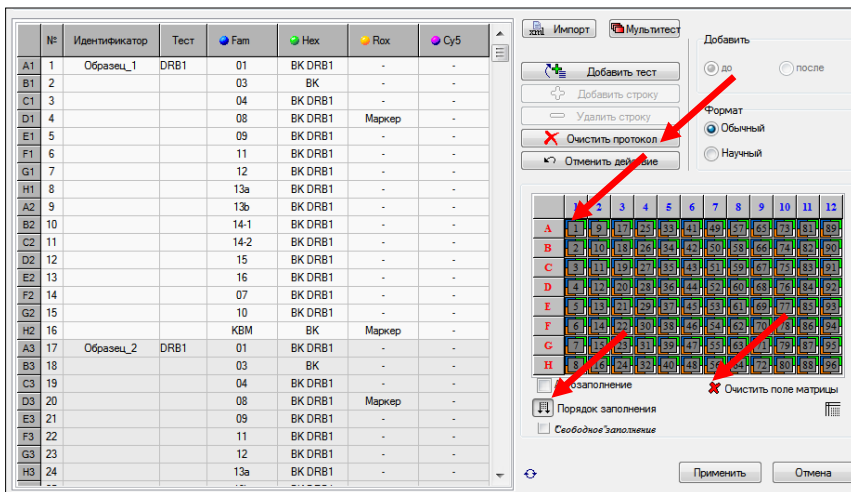
7.4.6 Отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (при ошибочном заполнении протокола нажмите кнопки «Очистить поле матрицы» -



или «Очистить протокол»



и «Порядок заполнения» – ).

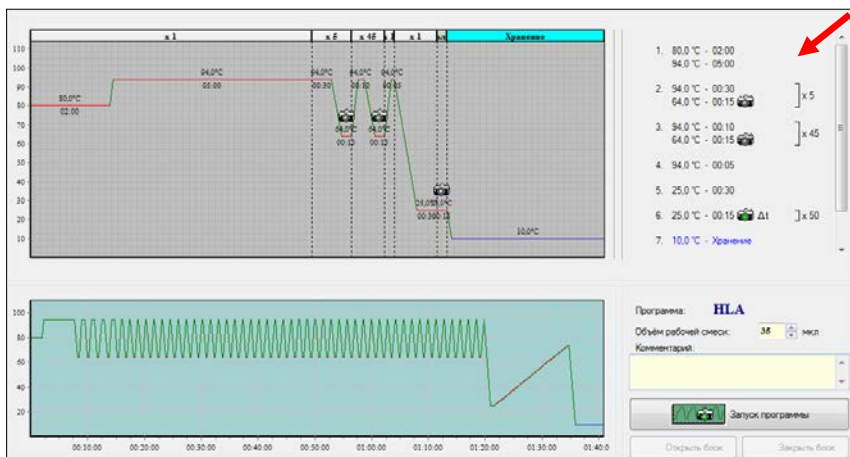


Если термоблок не заполнен полностью, рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой термоблока.



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.

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 АМПЛИКАЦИИ

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 (C_p) для специфического продукта и VK_{DRB1} (КВМ и ВК для пробирки 2 стрипа А и пробирки 8 стрипа Б), dC_p , результат по каждому образцу (качественный анализ для каждой пробирки и генотип для образца).

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчет.

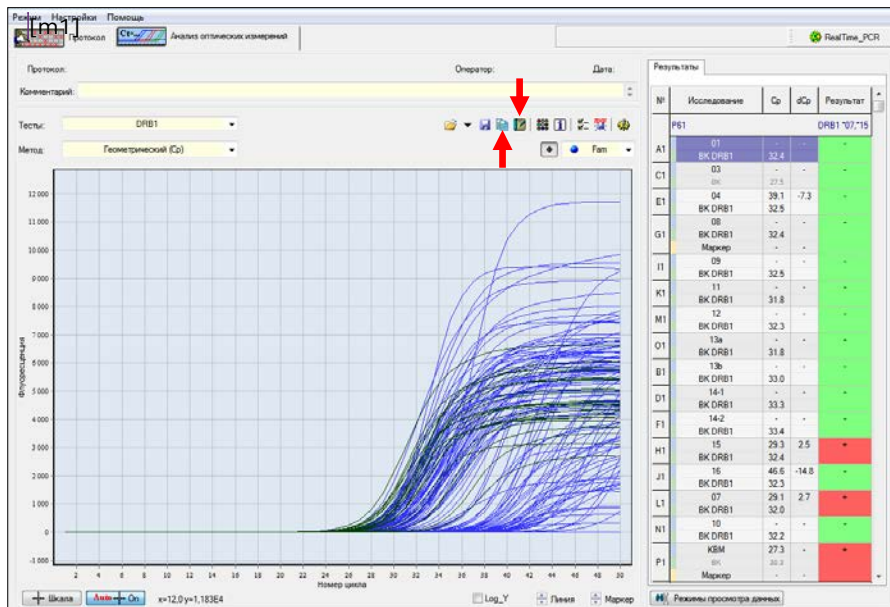
Для создания лабораторного отчета необходимо нажать

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

Идентификатор образца: P61

Логотип

Информация о лаборатории

№	Название исследования	Результаты
1	DRB1	*07,*15

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 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.

№	Исследование	Ср	dСр	Результат
	Образец_5			DRB1 *01,*13
A9	01	29.5	1.5	+
	БК DRB1	31.5		
B9	03	-	-	-
	БК	27.6		
C9	04	-	-	-
	БК DRB1	31.3		
D9	08	-	-	-
	БК DRB1	31.4		
	Маркер	-	-	
E9	09	-	-	-
	БК DRB1	31.3		
F9	11	42.4	-11.4	-
	БК DRB1	31.5		
G9	12	-	-	-
	БК DRB1	31.4		
H9	13а	29.1	1.9	+
	БК DRB1	31.0		
A10	13б	30.2	0.8	+
	БК DRB1	31.5		
B10	14-1	43.6	-12.6	-
	БК DRB1	32.2		
C10	14-2	-	-	-
	БК DRB1	32.1		
D10	15	-	-	-
	БК DRB1	32.2		

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

- 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	$\leq 32,0$	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

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.

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 от 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.

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

ООО «ДНК-Технология», 117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное, ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12, 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: 209-5
2021-07-12

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

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											+	+		
	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).

ООО «ДНК-Технология»
117587, Россия, г. Москва,
вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное,
ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12
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