

209-10 2024-08-06



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 02 августа 2024 года
Фасовка: стандартная (S)

REF R1-H001-S3/5

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1 НАЗНАЧЕНИЕ	5
2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА	6
2.1 Состав комплекта	6
2.2 Количество анализируемых проб	6
2.3 Принцип действия комплекта	6
2.4 Время проведения анализа	8
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКТА	8
3.1 Специфичность анализа	8
3.2 Чувствительность анализа	8
3.3 Диагностическая специфичность	8
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	9
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	10
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	11
6.1 Материал для исследования	11
6.2 Транспортировка и хранение исследуемого материала	11
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	11
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	11
7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции	12
7.3 Загрузка теста «DRB1» для детектирующих амплификаторов при первой постановке на данном компьютере	13
7.4 Ежедневная работа с тестом «DRB1»	13
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	14
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ	14
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	16
10.1 Транспортирование	16
10.2 Хранение	16
10.3 Указания по эксплуатации	16
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	17
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	17
Приложение А	18
Приложение Б (справочное)	19

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) 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 1 типа, одного из наиболее тяжелых 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 определенных 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 генов HLA ведет 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.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1** Настоящая инструкция распространяется на комплект реагентов для типирования гена DRB1, входящий в состав набора реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК (HLA-ДНК-ТЕХ), далее по тексту комплект реагентов.
- 1.2** 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.
- 1.3** Функциональное назначение: набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (определения специфичностей главного комплекса тканевой совместимости человека на уровне генов методом полимеразной цепной реакции).
Полученные результаты могут быть использованы для подбора гистосовместимого донора при трансплантации органов и тканей, для генетического прогнозирования иммуноопосредованных заболеваний и нарушений репродукции.
- 1.4** Комплект реагентов для типирования гена DRB1 предназначен для одновременного определения 13 групп аллелей гена DRB1 главного комплекса тканевой совместимости человека.
- 1.5** В качестве биологического материала используют периферическую кровь.
- 1.6** Комплект может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.
- 1.7** Применение комплекта реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.
- 1.8** Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории.
- 1.9** Применять комплект реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 Состав комплекта

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

Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок / флаконов	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином, стрип А	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость под воскообразным белым слоем	24 стрипа по 8 пробирок	по 20 мкл
Смеси для амплификации, запечатанные парафином, стрип Б	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость под воскообразным белым слоем	24 стрипа по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 флакон	8,0 мл
Положительный контрольный образец (K+ DRB1)	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 160 мкл
Крышки для стрипов	48 шт.		

2.2 Количество анализируемых проб

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

2.3 Принцип действия комплекта

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 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 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 генов 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 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 выделения ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация в режиме реального времени.

Для проведения ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени используют детектирующие амплификаторы (ООО «НПО ДНК-Технология»): ДТлайт¹, ДТпрайм² и ДТ-96 с программным обеспечением.

Для контроля качества проведения исследования используют контрольный образец "К+ DRB1", представляющий собой смеси клонированных участков гена HLA-DRB1, выявляемых с применением комплекта.

2.4 Время проведения анализа (без учета пробоподготовки): от 2,5 ч.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКТА

3.1 Специфичность анализа

Комплект реагентов для типирования гена DRB1 выявляет следующие группы аллелей гена HLA-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, ДТпрайм 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

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 и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных 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 включенным 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 СанПиН 3.3686-21. 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 комплекта реагентов в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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 требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий;
- микроцентрифуга-вортекс;
- ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объемом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объема одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 2 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл, от 200 до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток, свободные от ДНКаз и РНКаз, объемом 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 производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- версия ПО не ниже 7.5.5.23;
- ini файл с параметрами анализа.

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 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 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.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому набору реагентов. Рекомендуемые наборы (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.

О возможности использования других наборов (комплектов) реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с комплектом для ПЦР-амплификации можно узнать у представителя компании.

Независимо от используемого набора 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 объеме согласно инструкции к набору реагентов для выделения ДНК).

7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

ВНИМАНИЕ! Следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

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 4 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 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки стрипов.

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при RCF(g) 16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

2. 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 и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.5 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, в 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 термоблок детектирующего амплификатора.

7.2.9 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором».

При первом проведении ПЦР загрузите файл «HLA.ini», как это описано в п. 7.3. При последующих постановках добавьте в протокол тест «DRB1», как это описано в п.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 и проведите ПЦР.

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

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.

Тест «DRB1» (файл «HLA.ini») для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 предоставляется производителем комплекта.

7.3.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с комплектом реагентов для типирования гена 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»

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 (см. 7.3.4), выберите режим «Работа с прибором».

7.4.2 Нажмите кнопку «Добавить тест».

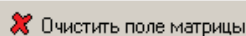
7.4.3 Выберите из списка тест "DRB1".

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

7.4.5 Укажите идентификаторы пробирок.

7.4.6 Отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (при необходимости нажмите кнопки

«Очистить поле матрицы» -



и «Порядок заполнения» - ).

- 7.4.7 Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол».
- В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации «HLA».
- 7.4.8 Нажмите кнопку «Запуск программы» в правом нижнем углу окна. 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.

На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторные циклы (C_p), результат по каждому образцу (качественный анализ для каждой пробирки и генотип для образца). По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

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.
- 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 C_p, полученные для системы контроля взятия материала (КВМ), как указано в таблице 2.

Таблица 2

№ пробирки / стрипа	Результат для KBM (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, либо повторное взятие клинического материала (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 KBM ≤ 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 3.

Таблица 3

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 положительных контрольных образцов 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 3, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

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

Допускается транспортирование комплекта реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 °C до 25 °C не более 5 суток.

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

10.2 Хранение

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

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

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

10.3 Указания по эксплуатации

- 10.3.1 Комплект должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

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

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

- 10.3.3 Комплекты с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 11.1** При использовании комплекта реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.
- 11.2** Комплекты реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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 в службу клиентской поддержки.

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

Адрес производителя:

Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС» (ООО «ДНК-Технология ТС»), 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

Код изготовителя указан на этикетке (см. последнюю цифру в серии комплекта):

- 1) ООО «НПО ДНК-Технология», 142281, Россия, Московская область, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д.3;
- 2) ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Символы, используемые при маркировке комплекта

	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Предел температуры (Температурный диапазон)
	Содержимого достаточно для проведения n тестов (Количество определений)
	Использовать до
	Код партии (код серии набора)
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению
	Номер по каталогу
	Изготовитель
	Не допускать воздействие солнечного света

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 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).