

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для дифференциального
определения делеций локуса AZF на Y-хромосоме человека
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
«РеалБест-Генетика AZF-микроделеции»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для дифференциального определения делеций локуса AZF на Y-хромосоме человека методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест-Генетика AZF-микроделеции)» предназначен для дифференциального определения делеций регионов AZFa, AZFb, AZFc локуса AZF на Y-хромосоме человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинического материала (*цельная кровь, буккальный эпителий*) проводится с помощью наборов: «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс», «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Микроделеции AZF затрагивают участки Y-хромосомы, удаление которых приводит к тяжёлым нарушениям сперматогенеза и, следовательно, к мужскому бесплодию. Термин «микроделеции» используется, поскольку размер локусов AZF недостаточен для выявления

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

цитогенетическими методами, однако на молекулярном уровне делеции охватывают протяжённые области ДНК длиной 0,8-7,7 млн п.н., включающие в себя по несколько генов. Стандартом молекулярно-генетического тестирования для обнаружения делеций AZF является выявление определённых уникальных маркерных последовательностей, расположенных в разных областях локуса AZF Y-хромосомы, по 2 маркера на каждый регион AZF (согласно европейскому руководству EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions). Отсутствие в образце ДНК пациента какой-либо группы маркеров свидетельствует о наличии делеции соответствующего локуса AZF.

Для выявления делеций локуса AZFa выбраны специфичные маркерные последовательности sY-84 и sY-86, для локуса AZFb – маркерные последовательности sY-127 и sY-134, для локуса AZFc – маркерные последовательности sY-254 и sY-255. Для контроля присутствия в образце ДНК Y-хромосомы и подтверждения принадлежности к мужскому полу производится выявление фрагмента гена SRY (определяет развитие зародыша по мужскому типу, отсутствует у женщин). Для подтверждения присутствия в пробе достаточного для анализа количества ДНК человека также совместно с маркерами Y-хромосомы проводится амплификация расположенного в аутосоме фрагмента гена HMBS. Принцип выявления тех или иных маркерных последовательностей ДНК основан на амплификации этих участков при помощи ПЦР и флуоресцентной детекции продуктов реакции в режиме реального времени.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой. В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичных для каждого участка ДНК человека гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи зонд расщепляется и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК человека в образце. Для детекции разных ампликонов используются четыре флуоресцентных красителя (FAM, HEX, ROX, Cy5), что позволяет сократить количество пробирок за счёт возможности одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Наличие делеций в том или ином локусе определяется как отсутствие сигнала амплификации по соответствующим маркерным последовательностям этого локуса.

2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

- контрольный образец (КО) – 1 пробирка (1,0 мл);
- готовая реакционная смесь для ПЦР №1 (ГРС-1), лиофилизированная – 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок);
- готовая реакционная смесь для ПЦР №2 (ГРС-2), лиофилизированная – 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок).

Принадлежности:

- оптическая плёнка – 1,5 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения делеций регионов AZFa, AZFb, AZFc локуса AZF на Y-хромосоме человека определяется по стандартному образцу предприятия, СОП (рег. № 05-2-569), как процент образцов, для которых получен правильный результат по наличию/отсутствию регионов AZFa, AZFb, AZFc в образцах №1, №2 и №3 СОП ДНК AZF-микроделеции и составляет 100%.

3.2. В КО должны выявляться ДНК маркерных последовательностей: sY-84, sY-86, sY-127, sY-134, sY-254, sY-255, SRY и выявляться достаточное для анализа количество ДНК человека.

3.3. Диагностическая специфичность дифференциального определения делеций регионов AZFa, AZFb, AZFc локуса AZF на Y-хромосоме человека: клинические испытания, проведенные на 219 образцах, показали 100% специфичность (интервал 98,6% - 100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

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

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

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материа-

лом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

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

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

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

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

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»).

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

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:

«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

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

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

– мини-шейкер PSU-2T (фирма «BioSan», Латвия);

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма «Eppendorf», Германия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фир-

ма «Biohit», Финляндия);

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

- термощейкер – термостатируемый встряхиватель орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 1300 об/мин и при температуре 65 °C (Thermo Shaker TS-100 с блоком SC20N, фирма «BioSan», Латвия);

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

- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTip», Финляндия);

- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 – 2 мл и 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);

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

- отсасыватель медицинский В-40 (фирма «Висма-Планар», Беларусь);

- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 2 мл (фирма «SSI», США, кат. № 2340);

- магнитный штатив для пробирок (фирма АО «Вектор-Бест», Россия);

- нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс», «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО, который является компонентом данного набора.

Если до проведения анализа образцы выделенной ДНК хранились в замороженном виде, разморозить их и выдержать не менее 30 минут при температуре (18-25) °C.

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

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС-1 и ГРС-2 в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °C не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая КО) пробирок с ГРС-1 и ГРС-2. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС-1 и ГРС-2 упаковать в це-

фленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

ГРС-1 и ГРС-2 после первого вскрытия упаковки хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

КО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с ГРС-1 и ГРС-2 пронумеровать и расположить в штативе.

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

7.2. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

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

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК и детекции флуоресцентных сигналов. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

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

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

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

7.7.1. ГРС-1:

«FAM» – регистрация ДНК гена половой принадлежности SRY;

«HEX» – регистрация сигнала ДНК маркерной последовательности sY-134;

«ROX» – регистрация сигнала ДНК маркерной последовательности sY-84;

«Cy5» – регистрация сигнала ДНК маркерной последовательности sY-254.

7.7.2. ГРС-2.

«FAM» – регистрация сигнала ДНК гена HMBS;

«HEX» – регистрация сигнала ДНК маркерной последовательности sY-127;

«ROX» – регистрация сигнала ДНК маркерной последовательности sY-86;

«Cy5» – регистрация сигнала ДНК маркерной последовательности sY-255.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, КО согласно инструкции к используемому прибору.

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

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Анализ результатов КО.

8.1.1. Для КО в ГРС-1 должно фиксироваться:

– нарастание сигнала амплификации ДНК SRY (канал «FAM»), ДНК sY-134 (канал «HEX»), ДНК sY-84 (канал «ROX»), ДНК sY-254 (канал «Cy5») и определяться значение порогового цикла Ct КО меньше 35;

8.1.2. Для КО в ГРС-2 должно фиксироваться:

– нарастание сигнала амплификации ДНК HMBS (канал «FAM») и определяться значение порогового цикла Ct КО меньше 33;

– нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК sY-127 (канал «HEX»), ДНК sY-86 (канал «ROX»), ДНК sY-255 (канал «Cy5») и определяться значение порогового цикла Ct КО меньше 35.

8.2. Анализ результатов валидации образца.

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в ГРС-2 должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации ДНК гена HMBS человека (канал «FAM»).

8.2.2. Анализируемый образец считается валидным, если для этого образца Ct по каналу «FAM» в ГРС-2 меньше или равно 33.

8.2.3. Для образцов, признанных не валидными (Ct по каналу «FAM» в ГРС-2 больше 33), необходимо провести повторный забор материала для исследования.

8.3. Анализ результатов ДНК гена половой принадлежности SRY.

8.3.1. Для образцов биологического материала, содержащих Y-хромосому, в ГРС-1 должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации ДНК гена SRY (канал «FAM»). Анализируемый образец считается положительным, если для этого образца Ct по каналу «FAM» в ГРС-1 меньше или равно 35.

8.3.2. Для образцов биологического материала, не содержащих Y-хромосому, в ГРС-1 не должно фиксироваться нарастания сигнала амплификации ДНК гена SRY (канал «FAM»). Анализируемый образец не учитывается, если для этого образца Ct по каналу «FAM» в ГРС-1 больше 35 или не определяется.

8.3.3. Для образцов, признанных валидными по п. 8.2, но у которых не обнаружен ген половой принадлежности SRY (Ct по каналу «FAM» в ГРС-1 больше 35 или не определяется), необходимо повторить исследование с повторного взятия клинического материала.

8.4. Анализ результатов определения делеций локуса AZF в исследуемых образцах.

Для образцов, признанных валидными по п. 8.2 и содержащими ген половой принадлежности SRY (п. 8.3), наличие делеций в том или ином локусе определяется как отсутствие сигнала амплификации по соответствующим маркерам этого локуса.

Соответствие результатов анализа образцов приведено в таблице:

Пробирка	Отсутствие сигнала детекции в канале или Ct больше 35 цикла			Ct по каналу детекции меньше 35 цикла		
	«ROX»	«HEX»	«Cy5»	«ROX»	«HEX»	«Cy5»
ГРС-1	делеция sY-84 (локус AZFa)	делеция sY-134 (локус AZFb)	делеция sY-254 (локус AZFc)	норма	норма	норма
ГРС-2	делеция sY-86 (локус AZFa)	делеция sY-127 (локус AZFb)	делеция sY-255 (локус AZFc)	норма	норма	норма

8.5. Диагностическая значимость определения делеций локусов AZFa, AZFb, AZFc на Y-хромосоме человека описана в литературе:

Simoni M., Bakker E. and Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004 // International Journal of Andrology. 2004. Vol. 27. P. 240–249.

Krausz C., Hoefsloot L., Simoni M. and Tüttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2013 // Andrology. 2014. Vol. 2. P. 5–19.

Ferlin A., Arredi B., Speltra E., Cazzadore C., Selice R., Garolla A., Lenzi A., Foresta C. Molecular and Clinical Characterization of Y Chromosome Microdeletions in Infertile Men: A 10-Year Experience in Italy // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2007. Vol. 92. N.3. P.762–770.

Poongothai J., Gopenath T.S., Manonayaki S. Genetics of human male infertility // Singapore Med. J. 2009. V.50. N.4. P.336-347.

Черных В.Б. AZF делеции – частая генетическая причина бесплодия у мужчин: современное состояние исследований // Проблемы репродукции. 2009. Т.1. С.10-15.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или

холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

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

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

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

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

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика AZF-микроделекции», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

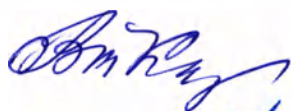
тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
АО «Вектор-Бест»

 А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Руководитель отдела
«Клинические исследования»
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»
м.п.



Р.С. Годунов

Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.

Руководитель отдела «Клинические исследования»
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»

Годунов Р.С.

2016 г.

