

Организация-производитель

Организация-разработчик

СОГЛАСОВАНО

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «НПО ДНК-Технология»Генеральный директор
ООО «НПО ДНК-Технология»
В.Ю. Дмитровский
«12» _____ 2022 г.
С.П. Левичев
«12» _____ 2022 г.**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**

**Набор реагентов для типирования генов
гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК
(HLA-ДНК-ТЕХ)**

Комплект реагентов для типирования генов DRB1, DQA1, DQB1

REF R1-H005-XA/7

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор
ООО «ДНК-Технология ТС»
С.А. Самарин
«12» _____ 2022 г.

2022 г.

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, 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.

Гены HLA-DRB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 относится к генам гистосовместимости человека (HLA) II класса. Известно более 2000 аллелей гена HLA-DRB1, сгруппированных в 13 групп аллелей (DRB1*01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15, *16), более 70 аллелей гена HLA-DQA1 (8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501,

*0601)) и более 900 аллелей гена HLA-DQB1, сгруппированных в 12 групп аллелей DQB1 (DQB1*02, *0301, *0302, *0303, *0304, *0305, *0401/0402, *0501, *0502/0504, *0503, *0601, *0602-8). Генотипирование по локусам HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1 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 генов DRB1, DQA1, DQB1 входящий в состав набора реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК (HLA-ДНК-ТЕХ).

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.

Полученные результаты могут быть использованы для подбора гистосовместимого донора при трансплантации органов и тканей, для генетического прогнозирования иммуноопосредованных заболеваний и нарушений репродукции.

1.3 Комплект реагентов для типирования генов DRB1, DQA1, DQB1 предназначен для: одновременного определения 13 групп аллелей гена DRB1, 8 аллелей и групп аллелей гена DQA1, и 12 групп аллелей гена DQB1 главного комплекса тканевой совместимости человека.

1.4 В качестве биологического материала используют периферическую кровь.

1.5 Комплект может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 Состав комплекта

Комплект реагентов для типирования генов DRB1, DQA1, DQB1 выпускается в фасовке для автоматизированного дозирования (маркируется – фасовка А) и включает следующие компоненты:

- Смесь для амплификации Стрим – тройной стрип, 24 пробирки (по 100 мкл);
- Полимераза ТехноТaq МАХ – 2 пробирки (по 60 мкл);
- ПЦР-буфер Стрим – 2 пробирки (по 600 мкл);
- Буфер для разведения ДНК – 4 пробирки (по 1,0 мл);
- Положительный контрольный образец ("K+ DRB1") – 2 пробирки (по 100 мкл);
- Положительный контрольный образец ("K+ DQ FAM") – 2 пробирки (по 100 мкл);
- Положительный контрольный образец ("K+ DQ HEX") – 2 пробирки (по 100 мкл);

Принадлежности:

- Пустые стрипы по 8 пробирок – 10 шт.
- Крышки для стрипов – 3 шт.

2.2 Число анализируемых проб

Комплект рассчитан на 16 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

Комплект реагентов может использоваться для следующих способов постановки: базовый способ постановки и интегрированный способ постановки.

При базовом способе постановки требуется предварительная подготовка реагентов и ДНК. Используется базовый (основной) комплект оборудования устройства дозирующего ДТстрим.

Интегрированный способ постановки предполагает использование дополнительного комплекта оборудования. Подготовка реагентов и раствора выделенной ДНК происходит в процессе запуска автоматически.

Возможна постановка, предполагающая единовременно 16 определений («Планшет 384»), или две постановки по 8 определений («Половина планшета 384»).

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.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного 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.

В некоторые смеси для амплификации введены сигнальные зонды. После окончания ПЦР проводится раунд температурного плавления дуплексов, образованных ампликонами и сигнальными зондами, в результате чего изменяется уровень флуоресценции, который фиксируется и представляется программным обеспечением прибора в виде графика. Если сигнальный зонд частично комплементарен ДНК-мишени, температура плавления такого дуплекса будет ниже температуры плавления дуплекса в случае полной комплементарности зонда. На основании совокупных данных о пороговых циклах амплификации и температуры плавления сигнальных зондов проводится интерпретация результатов анализа.

Комплект реагентов 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), 8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601) и 12 групп аллелей гена DQB1 (DQB1*02, *0301, *0302, *0303, *0304, *0305, *0401/0402, *0501, *0502/0504, *0503, *0601, *0602-8), в состав которых в том числе входит внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для контроля прохождения полимеразной цепной реакции, 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 состав ДНК-зондов, использующихся для детекции специфичностей генов DRB1, DQA1, DQB1, включены флуоресцентные метки Fam, Hex и Rox. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации внутреннего контрольного образца (ВК), входит флуоресцентный краситель Cy5 (таблица 1). 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 специфичностей генов DRB1, DQA1, DQB1 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 и ДТпрайм² с программным обеспечением.

Для контроля качества проведения исследования используют контрольные образцы "К+ DRB1", "К+ DQ FAM" и "К+ DQ HEX", представляющий собой смеси клонированных участков генов HLA-DRB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1, выявляемых с применением комплекта.

¹ только модели 4L1, 5L1, 6L1.

² только модели 4X1, 5X1, 6X1.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

№ пробирки в стрипе	Каналы детекции аллельных вариантов и внутреннего контроля					Цветовая маркировка смеси для амплификации
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5	
Стрип 1						
1	DRB1*01	BK DRB1	-	-	-	Голубая
2	DRB1*03	BK	-	-	-	Бесцветная
3	DRB1*04	BK DRB1	-	-	-	
4	DRB1*08		Маркер	-	-	
5	DRB1*09		-	-	-	
6	DRB1*11		-	-	-	
7	DRB1*12		-	-	-	
8	DRB1*13a		-	-	-	
Стрип 2						
1	DRB1*13b	BK DRB1	-	-	-	Бесцветная
2	DRB1*14-1		-	-	-	
3	DRB1*14-2		-	-	-	
4	DRB1*15		-	-	-	
5	DRB1*16		-	-	-	
6	DRB1*10	KBM	DRB1*07	-	-	
7	DQA1*0301	DQA1*0501	DQA1*0201	BK	-	
8	-	-	DQA1*0401, *0601	BK	-	
Стрип 3						
1	-	-	DQA1*0101, *0102, *0103	BK	-	Бесцветная
2	-	-	DQA1*0103, *0102, *0101	BK	-	
3	DQB1*03	DQB1* 0401/0402	DQB1*02	BK	-	
4	DQB1*05	DQB1*0601	DQB1*0602-8	BK	-	
5	-	-	DQB1*0302 или *0303	BK	-	
6	-	-	DQB1*0301 или *0304	BK	-	
7	DQB1*0305 или 0401/0402	-	-	BK	-	
8	DQB1*0501	DQB1*0503	DQB1*0502/ *0504	BK	-	

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКТА

3.1 Специфичность анализа

Комплекты реагентов для типирования генов DRB1, DQA1, DQB1 выявляет следующие аллели и группы аллелей:

13 групп аллелей гена DRB1 (DRB1*01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15, *16);

8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601);

12 групп аллелей гена DQB1 (DQB1*02, *0301, *0302, *0303, *0304, *0305, *0401/0402, *0501, *0502/0504, *0503, *0601, *0602-8)

В образцах биологического материала человека после завершения реакции амплификации программное обеспечение для прибора ДТлайт и ДТпрайм 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) %.

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», 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 клинко-диагностической лаборатории.

Выделение ДНК следует проводить в ламинарных шкафах с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР с использованием набора 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 клинко-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;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов комплекта;
- по истечению срока годности комплекта.

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;
- устройство дозирующее ДТстрим;
- устройство герметизирующее ДТпак;
- центрифуга для микропланшет ПЦР;
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 0,2 мл для амплификации или стрипованные пробирки (стрипы) объёмом 0,2 мл для амплификации;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объема одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 2 до 20 мкл, от 10 до 100 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток, свободные от ДНКаз и РНКаз, объёмом 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, рекомендуемая версия 7.7.5.44;
- ini файл с параметрами анализа.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материалы 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 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.

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 полимеразной цепной реакции (при базовом способе постановки)

7.2.1 Центрифугируйте стрипы со смесями для амплификации Стрим в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером Стрим и полимеразой ТехноТaq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq МАХ следует доставать из морозильника непосредственно перед использованием.

7.2.3 Приготовьте смесь ПЦР-буфера Стрим и полимеразы ТехноТaq МАХ, используя две пробирки с ПЦР-буфером Стрим и две пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ при постановке «Планшета 384» (16 определений одновременно), или одну пробирку с ПЦР-буфером Стрим и одну пробирку с полимеразой ТехноТaq МАХ при постановке «Половина планшета» (8 определений одновременно): внесите

в пробирку с ПЦР-буфером Стрим весь объем одной пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ.

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

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

7.2.5 Аккуратно, без образования воздушных пузырей, внесите в 8 пробирок пустого стрипа из комплекта по 140 мкл полученной смеси при постановке «Планшет 384» (16 определений одновременно) или по 75 мкл полученной смеси при постановке «Половина планшета 384» (8 определений одновременно).

7.2.6 Промаркируйте 2 пустых стрипа, из состава комплекта, при постановке «Планшет 384» (16 определений одновременно) или 1 пустой стрип при постановке «Половина планшета 384» (8 определений одновременно).

7.2.7 Внесите в каждую пробирку пустых стрипов по 125 мкл буфера для разведения ДНК.

7.2.8 Встряхните пробирки с полученным препаратом ДНК и положительными контрольными образцами «К+ DRB1», «К+ DQ FAM», «К+ DQ HEX», и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.9 Аккуратно, без образования воздушных пузырей добавьте в соответствующие пробирки стрипов по 50 мкл препарата ДНК исследуемых образцов, отрицательного контрольного образца («К-») и положительных контрольных образцов («К+ DRB1», «К+ DQ FAM», «К+ DQ HEX»).

7.2.10 Установить стрипы со смесями для амплификации Стрим, со смесью ПЦР-буфера Стрим и полимеразы ТехноТaq МАХ, с разведенными образцами ДНК, а также пустые стрипы, штатив с наконечниками, микропланшет для ПЦР (384 лунки) на рабочий стол ДТСтрим (см. Приложение А) и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.3 Подготовка полимеразной цепной реакции (при интегрированном способе постановки)

7.3.1 Центрифугируйте стрипы со смесями для амплификации Стрим в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером Стрим, буфером для разведения ДНК и полимеразой ТехноТaq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе. При постановке «Планшет 384» (16 определений одновременно) используется 2 пробирки с ПЦР-буфером Стрим, 4 пробирки с буфером для разведения ДНК и 2 пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ. При постановке «Половина планшета 384» (8 определений одновременно) используется 1 пробирка с ПЦР-буфером Стрим, 2 пробирки с буфером для разведения ДНК и 1 пробирка с полимеразой ТехноТaq МАХ.

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

7.3.3 Установить стрипы со смесями для амплификации Стрим, с ПЦР-буфером Стрим, с полимеразы ТехноТaq МАХ, с образцами ДНК, а также пустые стрипы, штатив с наконечниками, штатив без наконечников, микропланшет для ПЦР (384 лунки) на рабочий стол ДТСтрим (см. Приложение А) и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.4 Запечатывание планшетов (при базовом и интегрированном способах постановки)

7.4.1 Поместить аккуратно, не встряхивая микропланшет, в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТСтрим.

7.4.2 Провести процедуру запечатывания микропланшет термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.4.3 Центрифугировать микропланшет при 1000 об/мин в течение 30 с.

7.5 Проведение полимеразной цепной реакции (при базовом и интегрированном способах постановки)

7.5.1 Установите микропланшет в блок детектирующего амплификатора «ДТпрайм» (384 лунки), заполните протокол, используя параметр «Тест» в программном обеспечении для детектирующего амплификатора, укажите идентификаторы образцов.

ВНИМАНИЕ! Для создания теста и проведения ПЦР должен быть загружен ini-файл «HLA_A», поставляемый производителем.

7.5.2. Запустите программу детектирующего амплификатора, согласно руководству по эксплуатации.

При выборе тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 2.

Примечание – При использовании программы ЛИС пункт 7.5.2 необходимо проводить согласно инструкции к ЛИС.

Таблица 2 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов ДТлайт и ДТпрайм

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Δt , °C	Тип блока
1	80	0	05	15			Цикл
	94	0	05				
2	94	0	30	5			Цикл
	64	0	15		√		
3	94	0	5	45			Цикл
	64	0	15		√		
4	25	0	30	1			Цикл
5*	25	0	15	50	√	1,0	«Кривая плавления», $\Delta t=1$ °C; $T_{\text{кон}}=75$ °C
6	10	...	...	хранение			хранение

* При создании блока 5 отметить тип "Кривая плавления".

7.6 Загрузка тестов «HLA_DRB1», «HLA_DQA1» и «HLA_DQB1» для амплификаторов детектирующих при первой постановке на данном компьютере.

Тесты «HLA_DRB1», «HLA_DQA1» и «HLA_DQB1» (файл «HLA_A.ini») для приборов ДТлайт и ДТпрайм предоставляется производителем комплекта.

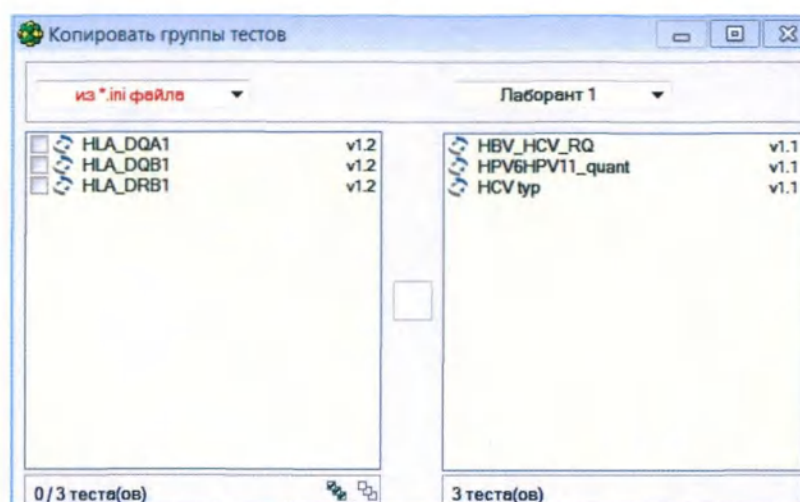
7.6.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с комплектом реагентов для типирования генов DRB1, DQA1, DQB1, выберите режим «Работа с прибором». При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.

7.6.2 В меню «Тест» выберите закладку «Копировать группы тестов».

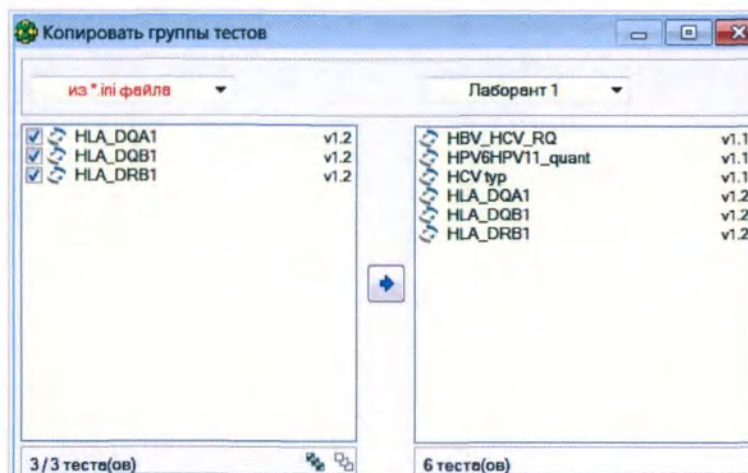


7.6.3 В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл «HLA_A».

7.6.4 В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которого необходимо скопировать тесты.



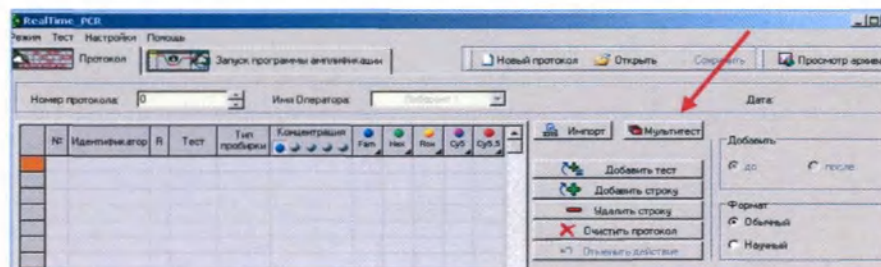
7.6.5 Выберите тесты для копирования. Нажмите кнопку , после чего выбранные тесты появятся в правой половине окна. Теперь с тестами может работать оператор, для которого был скопирован тест.



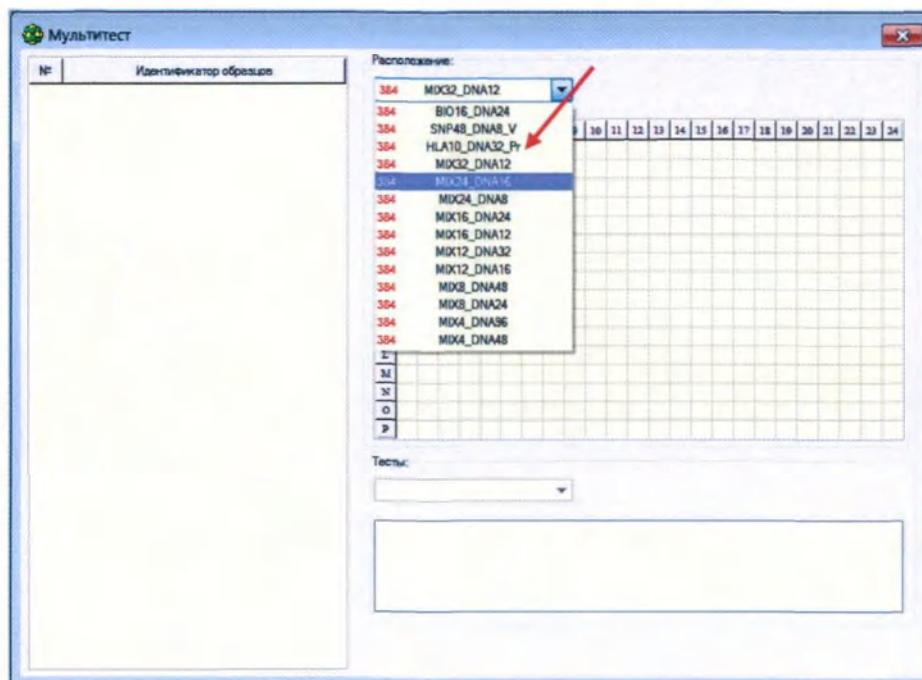
7.7 Ежедневная работа с тестами «HLA_DRB1», «HLA_DQA1», «HLA_DQB1».

7.7.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, для которого копировали тест (см. п.7.6.4), выберите режим «Работа с прибором».

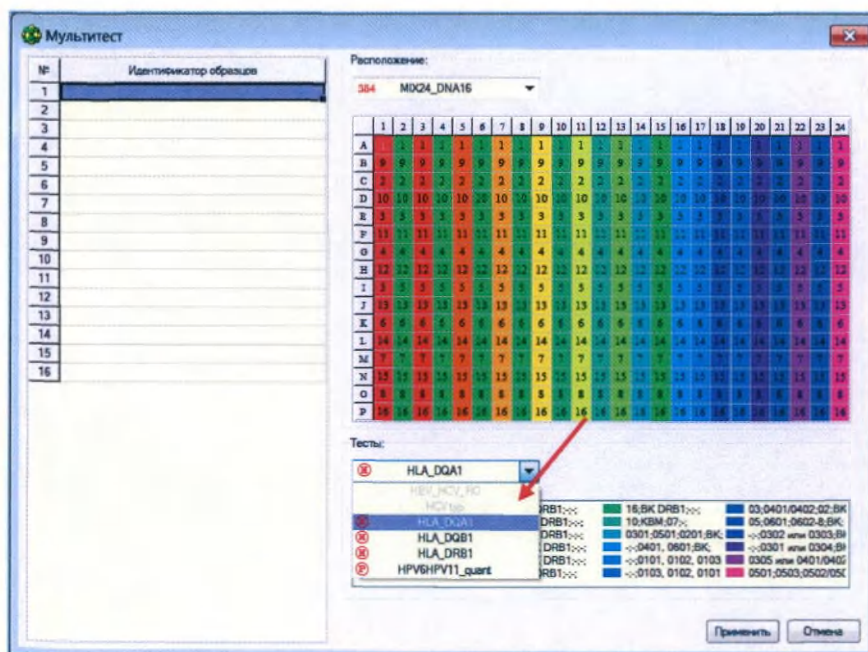
7.7.2 Нажмите кнопку «Мультитест».



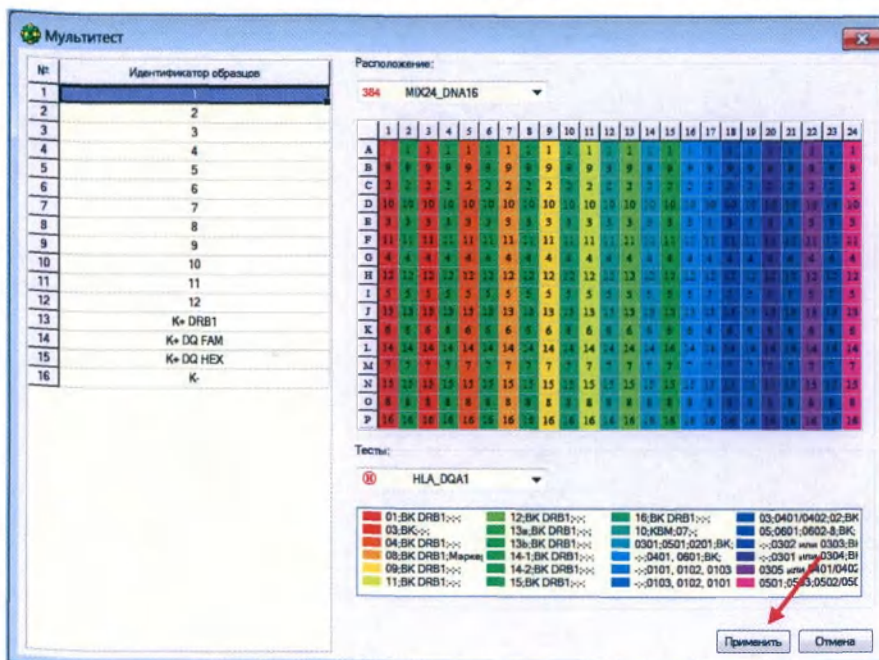
7.7.3 выберите тип расположения «MIX24_DNA16» при постановке «Планшет 384» (16 определений одновременно), или «MIX24_DNA8» при постановке «Половина планшета 384» (8 определений одновременно). Тип расположения образцов должен строго соответствовать сценарию дозирования для ДТстрим.



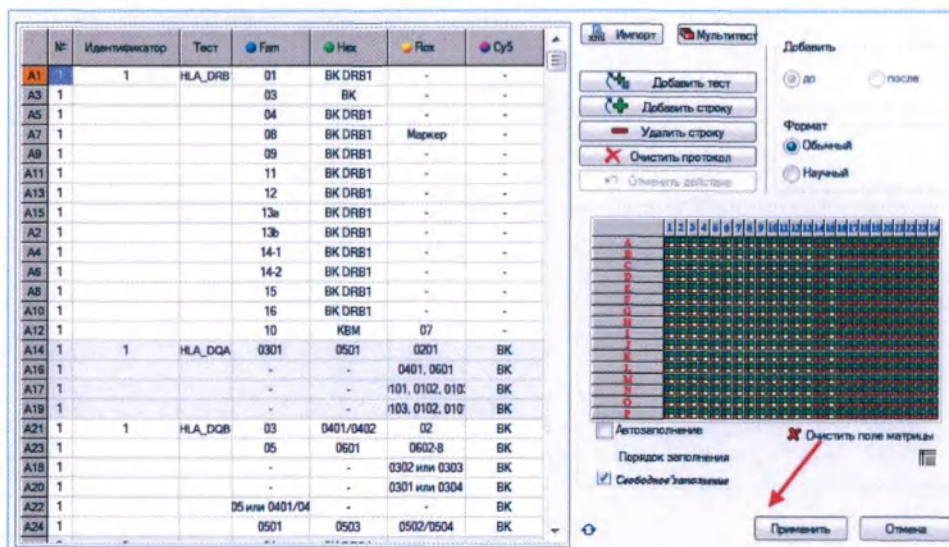
7.7.4 Выберите из списка любой из тестов «HLA_DRB1», «HLA_DQA1», «HLA_DQB1» (в режиме «Мультитест» образец анализируется по всем этим тестам одновременно вне зависимости от выбранного теста).



7.7.5 Укажите идентификаторы пробирок, нажмите кнопку "Применить".

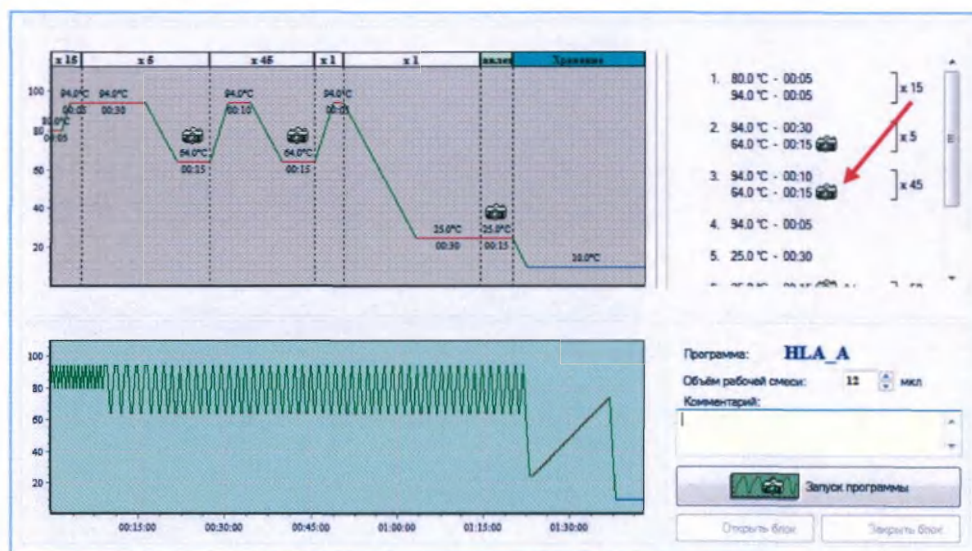


7.7.6 Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол».



7.7.7 В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации «HLA».

ВНИМАНИЕ! Объем рабочей смеси составляет 12 мкл.



7.4.9 Нажмите кнопку «Запуск программы» в правом нижнем углу окна.

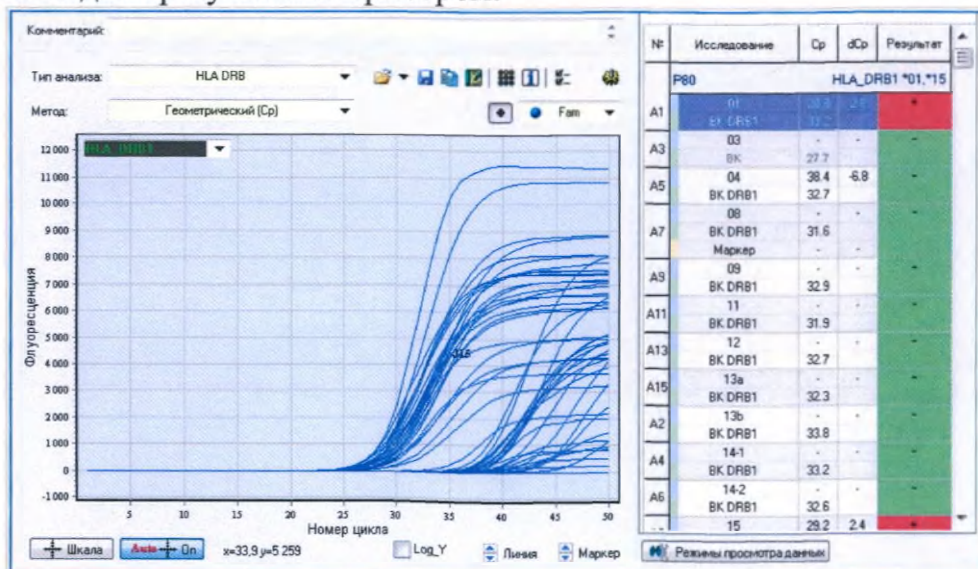
Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора, см. п. 7.6.1).

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

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

8.5 На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке для локуса DRB1. В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторный цикл (Cp) для специфического продукта и ВК DRB1 (ВК для пробирки 2 и KBM для пробирки 6), dCp, результат по каждому образцу (качественный анализ для каждой пробирки и генотип для образца). Для локусов DQA1 и DQB1 на графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла (режим PCR) или от температуры плавления (режим MC) для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторный цикл (Cp) для специфического продукта и ВК, результат по каждому образцу (качественный анализ или анализ кривых плавления для каждой пробирки и генотип для образца). По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчет.

Примеры выдачи результатов прибором:



9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Для получения результата по DRB1 используется тип анализа «HLA DRB».

9.2 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляются автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.

9.3 В случае получения гомозиготного генотипа для достоверности рекомендуется повторить исследование из того же препарата ДНК

9.4 Специфичности гена HLA DRB1 для каждого образца вычисляются программным обеспечением автоматически с учетом результатов по каждой пробирке для этого образца.

9.5 Результат по каждой пробирке данного образца не является генотипом образца. Результат генотипирования указан в верхней графе таблицы справа рядом с идентификатором образца. На приведенном примере для образца определены специфичности 04, 13a, 13b; итоговый результат генотипирования: DRB1*04, *13.

Результаты				
№	Исследование	Cp	dCp	Результат
	Сараев			HLA_DRB1 *04,*13
C1	01 BK DRB1	- 37.0	-	-
C3	03 BK	- 29.3	-	-
C5	04 BK DRB1	30.4 37.4	4.9	+
C7	08 BK DRB1 Маркер	- 37.2 -	- -	- -
C9	09 BK DRB1	- 37.2	-	-
C11	11 BK DRB1	- 36.1	-	-
C13	12 BK DRB1	- 36.6	-	-
C15	13a BK DRB1	31.3 36.3	4.0	+
C2	13b BK DRB1	31.6 35.3	3.7	+
C4	14-1 BK DRB1	41.3 36.5	-6.0	-
C6	14-2 BK DRB1	38.4 36.1	-3.1	-
C8	15 BK DRB1	- 36.5	-	-

Режимы просмотра данных

9.6 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 3.

Таблица 3

№ пробирки	Результат для КВМ (C_p)	Результат для ВК (C_p)	Интерпретация результата
14	$\leq 32,0$	C_p указан	ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве
	Более 32,0	C_p указан	ДНК присутствует в недостаточном для анализа количестве

9.7 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.

9.8 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).

9.9 Для отрицательных и положительных контрольных образцов должны быть получены результаты, указанные в таблице 4.

Таблица 4– Результаты генотипирования «К–», «К+ DRB1» для локуса DRB1

Идентификатор образца	№ пробирки/стрипа	Результат по специфике	Результат по ВК DRB1/ВК	Результат генотипирования
«К–»	Все исследования теста DRB1	C_p не указан	C_p не указан	?
«К+ DRB1»	Все исследования теста DRB1	C_p указан	C_p указан	

9.10 При получении для положительных контрольных образцов отрицательных значений по каналу Fam для всех специфичностей и Rox для DRB1*07 результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.11 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.

9.12 Для получения результата по DQA1 и DQB1 используется тип анализа «HLA DQ».

9.13 Специфичности генов HLA DQA1 и DQB1 для каждого образца вычисляются программным обеспечением автоматически с учётом результатов по каждой пробирке для этого образца.

9.14 Результат по каждой пробирке данного образца не является генотипом образца. Результат генотипирования указан в верхней графе таблицы справа рядом с идентификатором образца.

Результаты			
Кривая плавления		ВК	
№	Исследование	Ср	Результат
P82			HLA_DQA1 *0101,*0201
E14	0301	-	0201
	0501	-	
	0201	30.1	
	ВК	30.4	
E16	0401, 0601	45.1	-
	ВК	30.6	
E17	0101, 0102, 0103	29.1	0101
	ВК	30.5	
E19	0103, 0102, 0101	28.8	0101 или 0102
	ВК	30.4	

Результат генотипирования **DQA1*0101, *0201**

Результаты			
Кривая плавления		BK	
№	Исследование	Ср	Результат
P87	03	31.1	HLA_DQB1 *0301,*0602-8
	0401/0402	-	
	02	-	
	BK	30.7	
021	05	-	03
	0601	-	
	0602-8	30.2	
	BK	30.4	
023	0302 или 0303	-	0602-8
	BK	31.2	
	0301 или 0304	31.7	
	BK	30.3	
018	0305 или 0401/0402	-	0301
	BK	30.5	
	0501	-	
	0503	-	
020	0502/0504	-	0602-8
	BK	30.1	
	0501	-	
	0503	-	
022	0502/0504	-	0301
	BK	30.1	
	0501	-	
	0503	-	

Результат генотипирования **DQB1*0301, *0602-8**

9.15 В случае получения недостоверных или сомнительных результатов генотипирования ("?" или "нд") необходимо либо повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

9.16 Для отрицательных и положительных контрольных образцов должны быть получены результаты, указанные в таблицах 5 и 6.

9.17 При получении для положительных контрольных образцов отрицательных значений, не указанных в таблицах 5 и 6, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.18 При получении для отрицательного контрольного образца положительных значений, не указанных в таблицах 5 и 6, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

Таблица 5 – Результаты генотипирования «К-», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX» для локуса DQA1

Идентификатор образца	№ пробирки	Результат по специфике			Результат по ВК	Плавнение	Результат генотипирования
		Fam	Hex	Rox	Cy5		
К-	DQA1-1	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср указан ВК	-	-
	DQA1-2	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
	DQA1-3	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
	DQA1-4	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
К+ DQ FAM	DQA1-1	Ср указан 0301	Ср указан 0501	Ср указан 0201	Ср указан ВК	-	?
	DQA1-2	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0401	
	DQA1-3	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0101	
	DQA1-4	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0101 или 0102	
К+ DQ HEX	DQA1-1	Ср указан 0301	Ср указан 0501	Ср указан 0201	Ср указан ВК	-	?
	DQA1-2	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0601	
	DQA1-3	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0102 или 0103	
	DQA1-4	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0103	

Таблица 6 – Результаты генотипирования «К-», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX» для локуса DQB1

Идентифи- катор образца	№ пробирки	Результат по специфике			Результат по ВК	Плавление	Результат генотипирова- ния
		Fam	Hex	Rox	Cy5		
К-	DQB1-1	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср указан ВК	-	-
	DQB1-2	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср указан ВК	-	
	DQB1-3	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
	DQB1-4	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
	DQB1-5	Ср не указан	-	-	Ср указан ВК	-	
	DQB1-6	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср указан ВК	-	
К+ DQ FAM	DQB1-1	Ср указан 03	Ср указан 0401/0402	Ср указан 02	Ср указан ВК	-	?
	DQB1-2	Ср указан 05	Ср указан 0601	Ср указан 0602-8	Ср указан ВК	-	
	DQB1-3	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0302	
	DQB1-4	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0304	
	DQB1-5	Ср указан 0305 или 0401/0402	-	-	Ср указан ВК	-	
	DQB1-6	Ср указан 0501	Ср указан 0503	Ср указан 0502/0504	Ср указан ВК	-	
К+ DQ HEX	DQB1-1	Ср указан 03	Ср указан 0401/0402	Ср указан 02	Ср указан ВК	-	?
	DQB1-2	Ср указан 05	Ср указан 0601	Ср указан 0602-8	Ср указан ВК	-	
	DQB1-3	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0302,0303	
	DQB1-4	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0301	
	DQB1-5	Ср указан 0305 или 0401/0402	-	-	Ср указан ВК	-	
	DQB1-6	Ср указан 0501	Ср указан 0503	Ср указан 0502/0504	Ср указан ВК	-	

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 Допускается транспортировка комплекта реагентов на льду не более 72 часов.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Комплект реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ, следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках в течение всего срока годности комплекта.

10.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в морозильных камерах в течение всего срока годности комплекта.

10.2.3 Смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности комплекта.

10.2.4 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 утвержденной инструкции по применению.

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

- при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ;

- полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере 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 при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора.

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 генов DRB1, DQA1, DQB1, 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:

ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская область, г. Протвино,
ул. Железнодорожная, д. 20

Место производства:

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

1. ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская область,
г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20

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

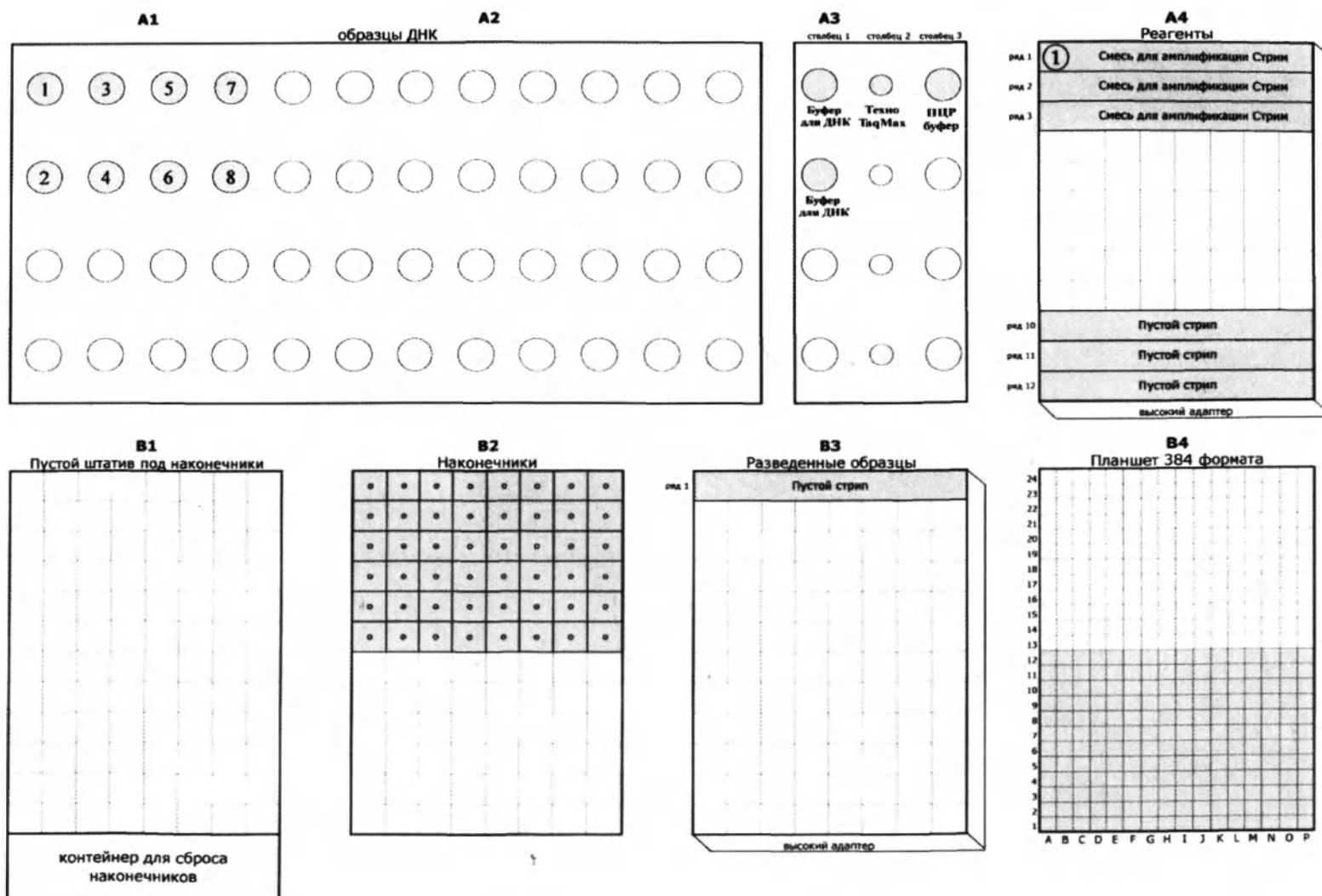
Приложение А

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

 ООО ЦИПМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Рис. Б4. Заполнение рабочего стола ДТстрим при интегрированном способе постановки «Половина планшета 384» (8 определений единовременно).



Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 36

(тридцать шесть) листа (ов)

специалист по регистрации

Назарев А.М.

Назарев



Организация-производитель

Организация-разработчик

СОГЛАСОВАНО**УТВЕРЖДАЮ**Генеральный директор
ООО «НПО ДНК-Технология»Генеральный директор
ООО «НПО ДНК-Технология»

В.Ю. Дмитриовский

С.П. Левичев

2022 г.

2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**Набор реагентов для типирования генов****гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК
(HLA-ДНК-ТЕХ)****Комплект реагентов для типирования гена DRB1**

REF

R1-H001-S3/5

СОГЛАСОВАНОГенеральный директор
ООО «ДНК-Технология ТС»

С.А. Самарин

« 12 » 2022 г.

2022 г.

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).

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.

Полученные результаты могут быть использованы для подбора гистосовместимого донора при трансплантации органов и тканей, для генетического прогнозирования иммуноопосредованных заболеваний и нарушений репродукции.

1.3 Комплект реагентов для типирования гена DRB1 предназначен для одновременного определения 13 групп аллелей гена DRB1 главного комплекса тканевой совместимости человека.

1.4 В качестве биологического материала используют периферическую кровь.

1.5 Комплект может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 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 20 мкл);
- Смеси для амплификации, запечатанные парафином, стрип Б – 24 стрипа (по 20 мкл);
- Раствор Таq-полимеразы – 4 пробирки (по 1,0 мл);
- Минеральное масло – 1 флакон (8,0 мл).
- Положительный контрольный образец ("К+ DRB1") – 2 пробирки (по 160 мкл);
- Крышки для стрипов – 48 шт.

2.2 Число 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 Таq-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 специфичного 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

№ проби рки 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	БК DRB1	-	-	-	Голубая	Белый
2	03	БК	-	-	-	Бесцветная	
3	04	БК DRB1	-	-	-		
4	08		Маркер	-	-		
5	09		-	-	-		
6	11		-	-	-		
7	12		-	-	-		
8	13a	-	-	-			
Стрип Б							
1	13b	БК DRB1	-	-	-	Голубая	Голубой
2	14-1		-	-	-	Бесцветная	
3	14-2		-	-	-		
4	15		-	-	-		
5	16		-	-	-		
6	07		-	-	-		
7	10		-	-	-		
8	КВМ	БК	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.

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

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

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) %.

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», 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 клинко-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 клинко-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;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 0,2 мл для амплификации или стрипованные пробирки (стрипы) объёмом 0,2 мл для амплификации;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объема одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы 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, объёмом 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, рекомендуемая версия 7.7.5.44;
- ini файл с параметрами анализа.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материалы 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 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.

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

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 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 Taq-полимеразы.

7.2.4 Добавьте в каждую пробирку стрипов по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки стрипов.

ВНИМАНИЕ! 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.

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 амплификатора детектирующего. 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», 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. 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, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Δt , °C	Тип блока
1	80	2	00	1			Цикл
	94	5	00				
2	94	0	30	5			Цикл
	64	0	15		√		
3	94	0	5	45			Цикл
	64	0	15		√		
4	25	0	30	1			Цикл
5*	25	0	15	50	√	1,0	«Кривая плавления», $\Delta t=1$ °C; $T_{\text{кон}}=75$ °C
6	10	...	...	хранение			хранение

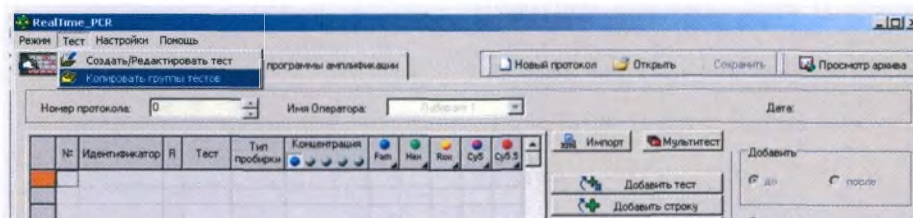
* При создании блока 5 отметить тип "Кривая плавления".

7.3 Загрузка теста «DRB1» для амплификаторов детектирующих при первой постановке на данном компьютере

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

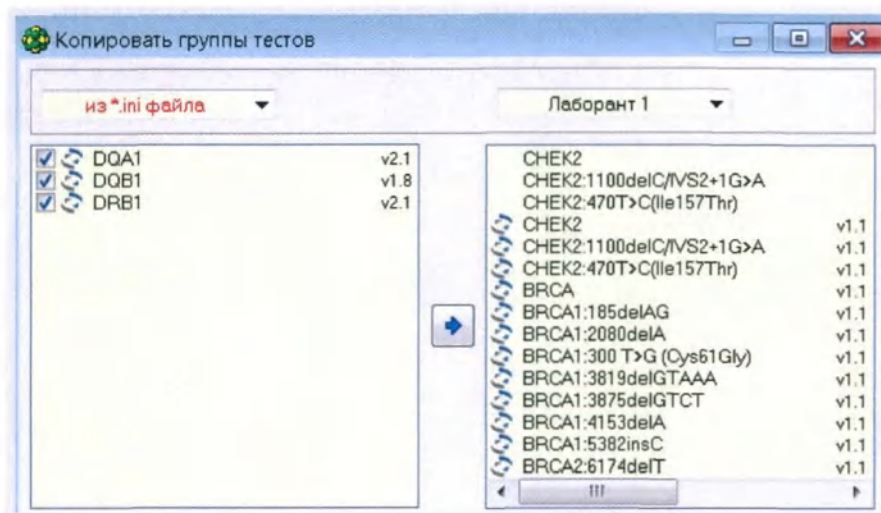
7.3.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с комплектом реагентов для типирования гена DRB1, выберите режим «Работа с прибором». При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.

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

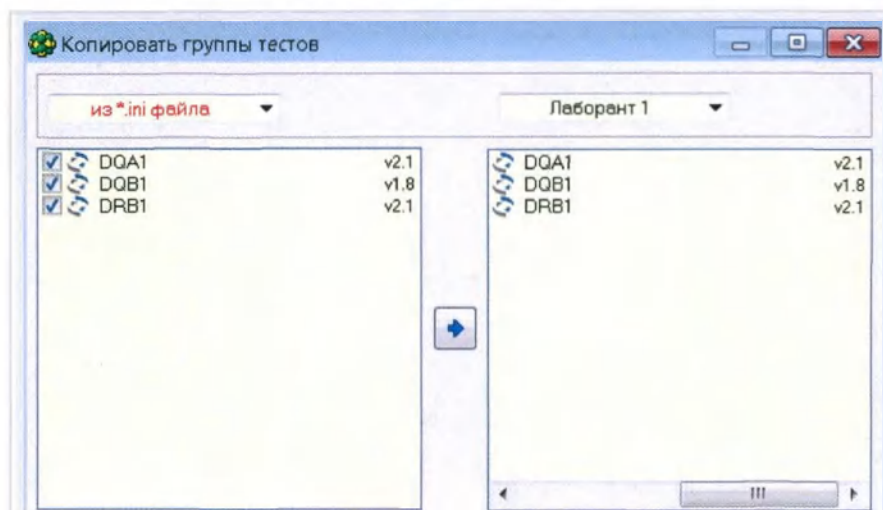


7.3.3 В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл «HLA»

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



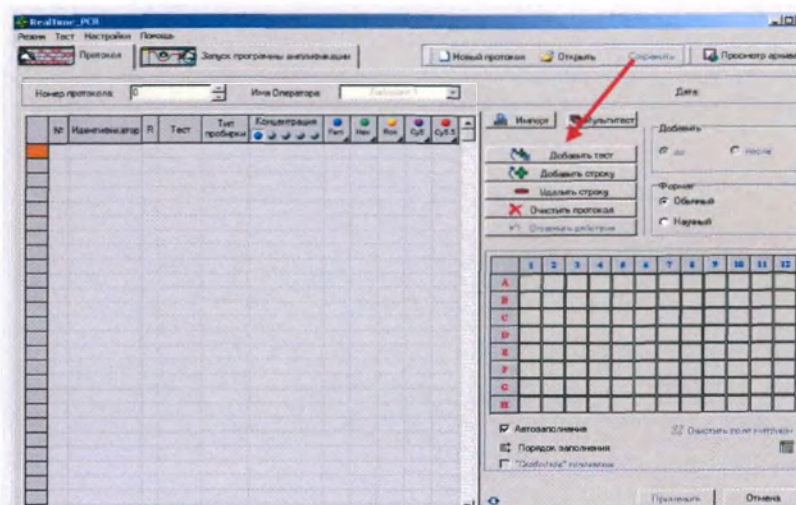
7.3.5 Выберите тесты для копирования. Нажмите кнопку , после чего выбранные тесты появятся в правой половине окна. Теперь с тестом «DRB1» может работать оператор, для которого был скопирован тест.



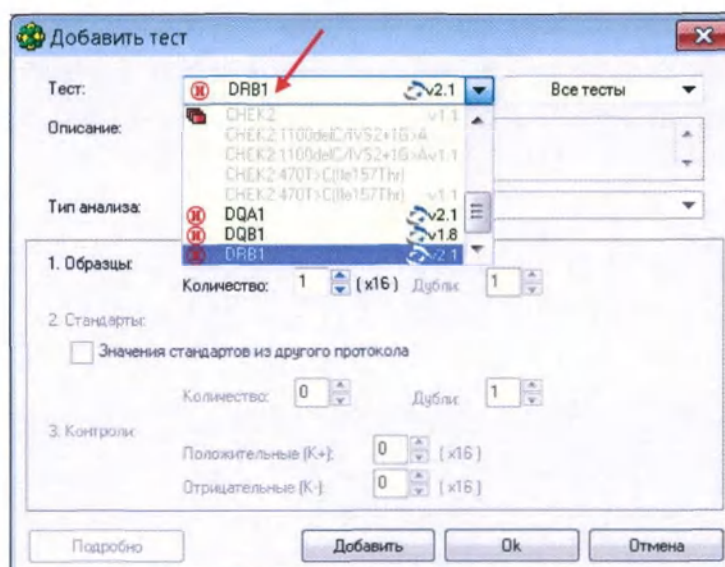
7.4 Ежедневная работа с тестом «DRB1»

7.4.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, для которого копировали тест (см. п.7.3.4), выберите режим «Работа с прибором».

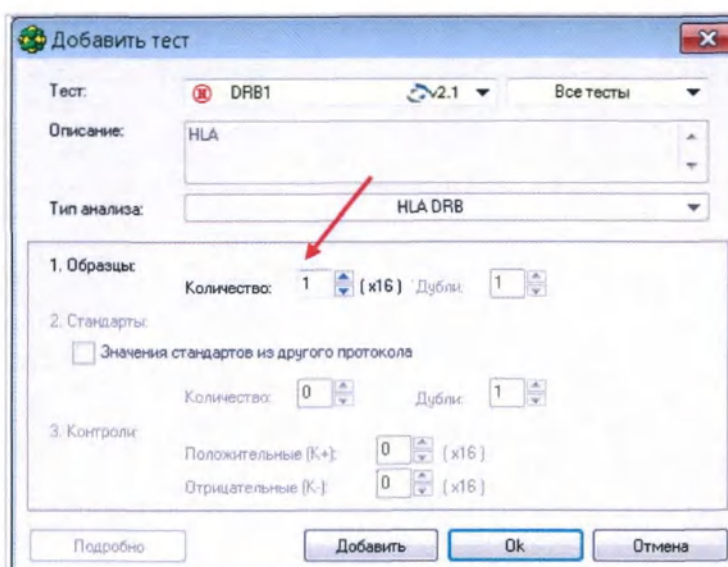
7.4.2 Нажмите кнопку «Добавить тест»



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».



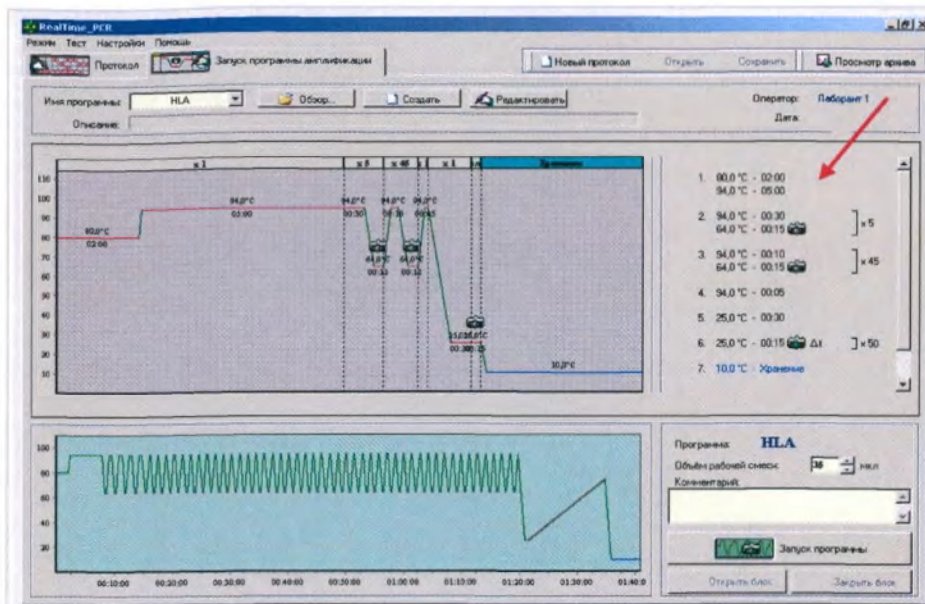
7.4.5 Укажите идентификаторы пробирок.

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

-  Очистить поле матрицы и «Порядок заполнения» - ).

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.

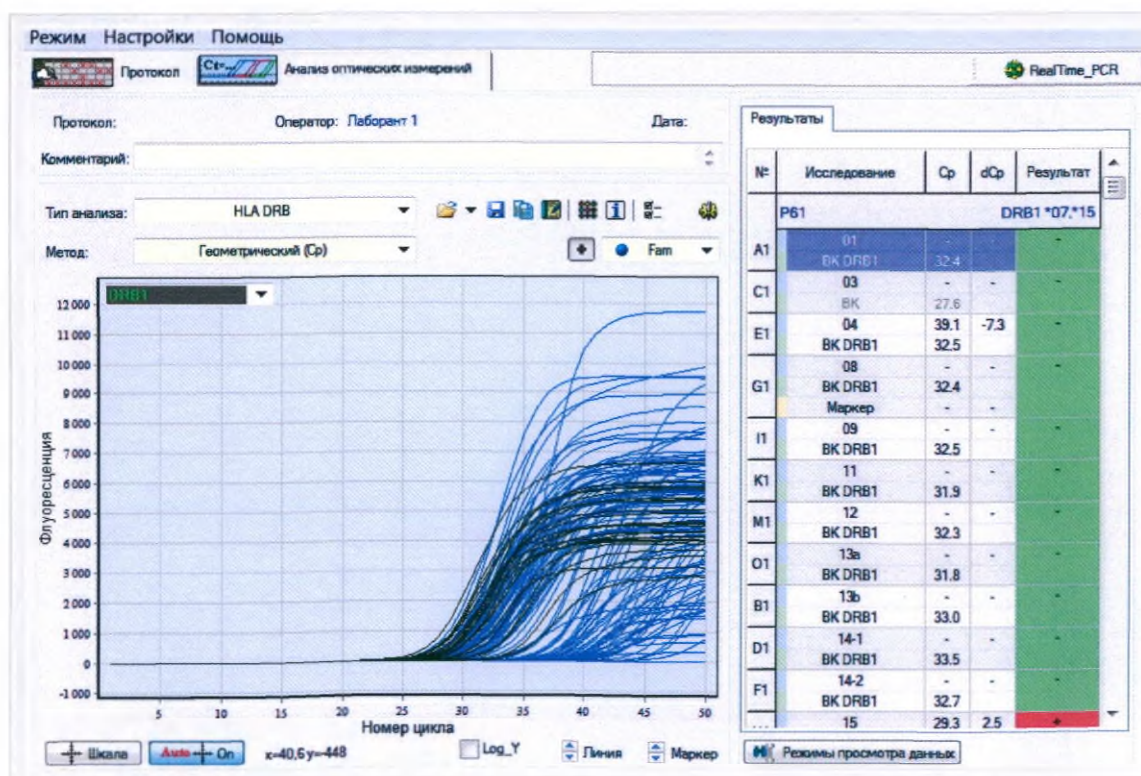
Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора, см. п. 7.3.1).

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

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

8.2 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 отчет.

Пример выдачи результатов прибором:



9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляются автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.

9.2 Специфичности гена HLA DRB1 для каждого образца вычисляются программным обеспечением автоматически с учетом результатов по каждой пробирке для этого образца.

9.3 Результат по каждой пробирке данного образца не является генотипом образца. Результат генотипирования указан в верхней графе таблицы справа рядом с идентификатором образца. На приведенном примере для образца №5 определены специфичности 01, 13a, 13b; итоговый результат генотипирования: DRB1*01, *13.

Результаты				
№	Исследование	Cp	dCp	Результат
Образец 5				DRB1 *01,*13
A9	01	29.5	1.5	+
	BK DRB1	31.5		
B9	03	-	-	-
	BK	27.6		
C9	04	-	-	-
	BK DRB1	31.3		
D9	08	-	-	-
	BK DRB1	31.4		
E9	Маркер	-	-	-
	09	-	-	-
F9	BK DRB1	31.3		
	11	42.4	-11.4	-
G9	BK DRB1	31.5		
	12	-	-	-
H9	BK DRB1	31.4		
	13a	29.1	1.9	+
A10	BK DRB1	31.0		
	13b	30.2	0.8	+
B10	BK DRB1	31.5		
	14-1	43.6	-12.6	-
C10	BK DRB1	32.2		
	14-2	-	-	-
D10	BK DRB1	32.1		
	15	-	-	-

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	≤ 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).

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 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 4, 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.

10.1.2 Допускается транспортировка комплекта реагентов на льду не более 72 часов.

10.1.3 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 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 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 в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках;

- смеси для амплификации 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 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:

ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская область, г. Протвино,
ул. Железнодорожная, д. 20

Место производства:

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

1. ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская область,
г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20

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

Приложение А
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

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 27
(двадцать семь) листа (ов)
специалист по регистрации
Лазарев А.М. Лазарев



Организация-производитель

Организация-разработчик

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор
ООО «НПО ДНК-Технология»

В.Ю. Дмитриевский

« 12 » _____ 2022 г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «НПО ДНК-Технология»

С.П. Левичев

« 12 » _____ 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**Набор реагентов для типирования генов****гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК****(HLA-ДНК-ТЕХ) по ТУ 9398-411-46482062-2016****Комплект реагентов для типирования гена DQA1**

REF R1-H002-N3/5

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор
ООО «ДНК-Технология ТС»

С.А. Самарин

« 12 » _____ 2022 г.

2022г.

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-DQA1 относится к генам гистосовместимости человека (HLA) II класса, обладает выраженным полиморфизмом. Известно более 70 аллелей данного гена (8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601)). Генотипирование по локусу DQA1 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.

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 DQA1 входящий в состав набора реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК (HLA-ДНК-ТЕХ).

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.

Полученные результаты могут быть использованы для подбора гистосовместимого донора при трансплантации органов и тканей, для генетического прогнозирования иммуноопосредованных заболеваний и нарушений репродукции.

1.3 Комплект реагентов для типирования гена DQA1 предназначен для одновременного определения 8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601) главного комплекса тканевой совместимости человека.

1.4 В качестве биологического материала используют периферическую кровь.

1.5 Комплект реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 Состав комплекта

Комплект реагентов для типирования гена DQA1 выпускается в универсальной фасовке (маркируется – фасовка U) и включает следующие компоненты:

- Смеси для амплификации:
 - DQA1-1 – 1 пробирка (480 мкл);
 - DQA1-2 – 1 пробирка (480 мкл);
 - DQA1-3 – 1 пробирка (480 мкл);
 - DQA1-4 – 1 пробирка (480 мкл);
- Полимераза ТехноТaq MAX – 1 пробирка (48 мкл);
- ПЦР-буфер – 2 пробирки (по 500 мкл);
- Минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- Положительный контрольный образец ("K+ DQ FAM") – 1 пробирка (100 мкл);
- Положительный контрольный образец ("K+ DQ HEX") – 1 пробирка (100 мкл).

2.2 Число 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.

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.

В некоторые смеси для амплификации введены сигнальные зонды, содержащие флуоресцентные метки Fam и Hex. После окончания ПЦР проводится раунд температурного плавления дуплексов, образованных ампликонами и сигнальными зондами, в результате чего изменяется уровень флуоресценции, который фиксируется и представляется программным обеспечением прибора в виде графика. Если сигнальный зонд частично комплементарен ДНК-мишени, температура плавления такого дуплекса будет ниже температуры плавления дуплекса в случае полной комплементарности зонда. На основании совокупных данных о пороговых циклах амплификации и температуры плавления сигнальных зондов проводится интерпретация результатов анализа.

Комплект реагентов для типирования генов DQA1 включает смеси для амплификации, специфичные для 8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601), в состав которых в том числе входит внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции специфичностей гена DQA1, включены флуоресцентные метки Fam, Hex и Rox. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации внутреннего контрольного образца (ВК), входит флуоресцентный краситель Cy5 (таблица 1). Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Для контроля качества проведения исследования используют контрольные образцы "K+ DQ FAM" и "K+ DQ HEX", представляющий собой смеси клонированных участков генов HLA-DQA1 и HLA-DQB1, выявляемых с применением комплекта.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Наименование смеси для амплификации	Каналы детекции аллельных вариантов и внутреннего контроля				
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
DQA1-1	0301	0501	0201	ВК	-
DQA1-2	-	-	0401, 0601	ВК	-
DQA1-3	-	-	0101, 0102, 0103	ВК	-
DQA1-4	-	-	0103, 0102, 0101	ВК	-

Исследование с использованием комплекта реагентов для типирования гена DQA1 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.

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

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

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКТА

3.1 Специфичность анализа

Комплект реагентов для типирования гена DQA1 выявляет следующие 8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601). Перечень определяемых аллелей приведен в таблице 2.

Таблица 2 – Обозначение аллелей и групп аллелей

Обозначение аллеля/группы аллелей	Аллели, входящие в группу	
	Названия аллелей согласно номенклатуре HLA, принятой до 1 апреля 2010 г.	Названия аллелей согласно номенклатуре HLA, принятой с 1 апреля 2010 г.
DQA1*0101	DQA1*0101/*0104/*0105/ *0107/*0112	DQA1*01:01/*01:04/*01:05/ *01:07/01:12
DQA1*0102	DQA1*0102/*0106/0108/ *0109/*0111	DQA1*01:02/*01:06/*01:08/ *01:09/*01:11
DQA1*0103	DQA1*0103/*0110	DQA1*01:03/*01:10
DQA1*0201	DQA1*0201	DQA1*02:01
DQA1*0301	DQA1*0301-*0303	DQA1*03:01-*03:03
DQA1*0401	DQA1*0401-*0404	DQA1*04:01-04:04
DQA1*0501	DQA1*0501-*0511	DQA1*05:01-*05:11
DQA1*0601	DQA1*0601-*0602	DQA1*06:01-*06:02

В образцах биологического материала человека 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. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу комплекта реагентов.

Для оценки количества выделенной ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени (КВМ) производства ООО «НПО ДНК-Технология».

При использовании комплекта реагентов для типирования гена DQA1 совместно с комплектом реагентов для типирования гена DRB1 можно учитывать результаты определения КВМ, полученные при использовании комплекта реагентов для типирования DRB1. Если полученное для КВМ значение C_p более 32, оператор должен трактовать это как недостаточное для анализа количество ДНК.

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

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», 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 клинико-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 клинико-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 реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий;
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объемом 1,5 мл;
- пробирки одноразовые пластиковые объемом 0,2 мл для амплификации или стрипованные пробирки (стрипы) объемом 0,2 мл для амплификации;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл или 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 10 до 100 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл;

- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток, свободные от ДНКаза 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, рекомендуемая версия 7.7.5.44;
- ini файл с параметрами анализа.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материалы 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 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.

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 реагентов 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

7.2.1 Промаркируйте по 6 пробирок для амплификации объемом 0,2 мл для каждого анализируемого образца и отрицательного контрольного образца («К-»), положительного контрольного образца «К+ DQ FAM» и положительного контрольного образца «К+ DQ HEX».

Например, необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 30 пробирок для исследуемых образцов и 18 пробирок для «К-», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX». Общее количество пробирок – 48.

7.2.2 Встряхните пробирки со смесями для амплификации в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Внесите в промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации (соответственно маркировке в пробирку 1 внесите смесь

DQB1-1, в пробирку 2 – смесь DQB1-2 и т.д.).

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

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

7.2.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq МАХ. Смешайте в отдельной пробирке:

10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,

0,5 x (N+1) мкл полимеразы ТехноТaq МАХ,

где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К–», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX».

Например, необходимо проанализировать 5 образцов, «К–», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX». Промаркированных пробирок – 48. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ для 49 (48+1) пробирок, т.е. 490 мкл ПЦР-буфера + 24,5 мкл полимеразы ТехноТaq МАХ.

7.2.6 Встряхните пробирку в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

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

7.2.7 Добавьте в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ в пробирки со смесями для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить пп. 7.2.8 – 7.2.13.

7.2.8 Добавьте в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.

7.2.9 Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (6 шт. для каждого образца) по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. Для

предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.10 Внесите в пробирки, маркированные «К–», по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК. Внесите в пробирки, маркированные «К+ DQ FAM», по 5,0 мкл положительного контрольного образца «К+ DQ FAM». Внесите в пробирки, маркированные «К+ DQ HEX», по 5,0 мкл положительного контрольного образца «К+ DQ HEX».

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

7.2.12 Установите все пробирки в термоблок амплификатора детектирующего. Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.

7.2.13 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 «DQA1», 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. При выборе теста «DQA1» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 3.

**Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов
ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96**

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Δt , °C	Тип блока
1	80	2	00	1			Цикл
	94	5	00				
2	94	0	30	5			Цикл
	64	0	15		√		
3	94	0	5	45			Цикл
	64	0	15		√		
4	25	0	30	1			Цикл
5*	25	0	15	50	√	1,0	«Кривая плавления», $\Delta t=1$ °C; $T_{\text{кон}}=75$ °C
6	10	...	...	хранение			хранение

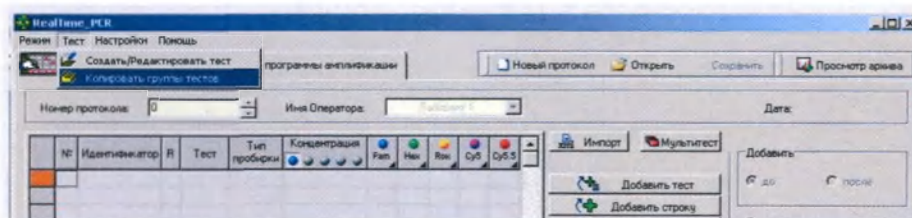
* При создании блока 5 отметить тип "Кривая плавления".

7.3 Загрузка теста «DQA1» для амплификаторов детектирующих при первой постановке на данном компьютере

Тест «DQA1» (файл «HLA.ini») для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 предоставляется производителем комплекта.

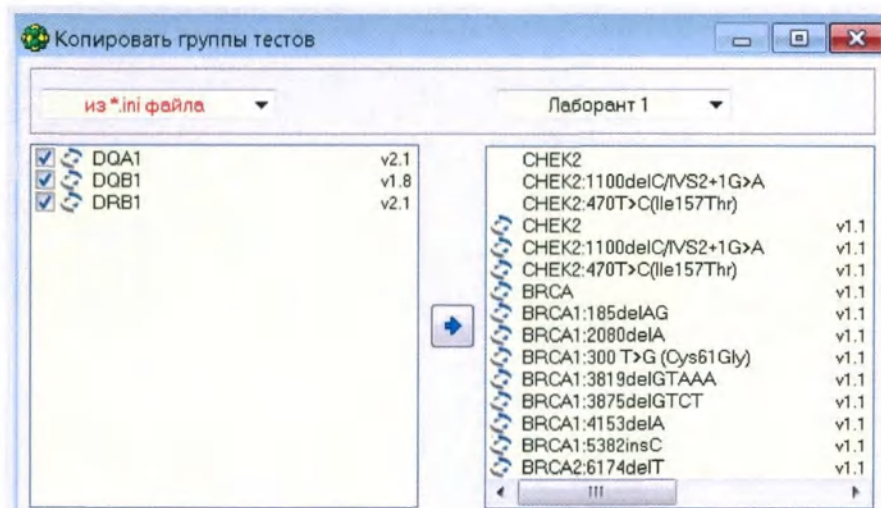
7.3.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с комплектом реагентов для типирования гена DQA1, выберите режим «Работа с прибором». При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.

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

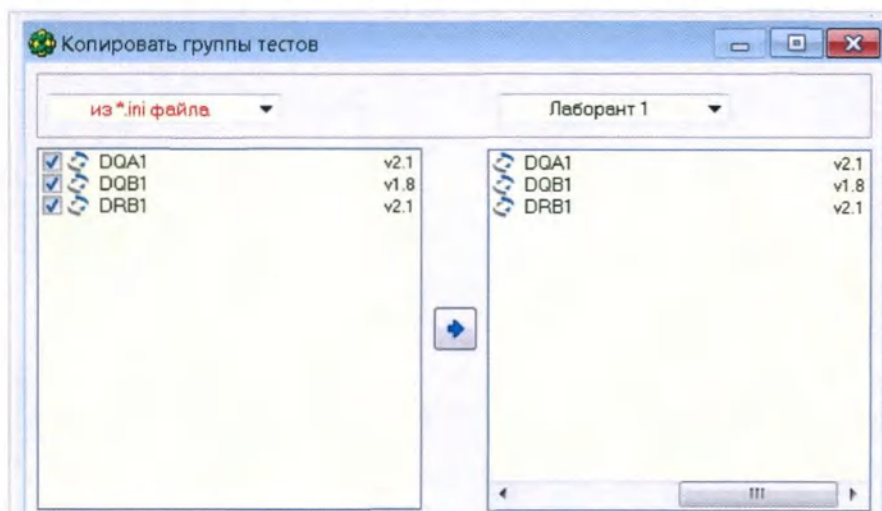


7.3.3 В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл «HLA»

7.3.4 В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которого необходимо скопировать тест «DQA1».



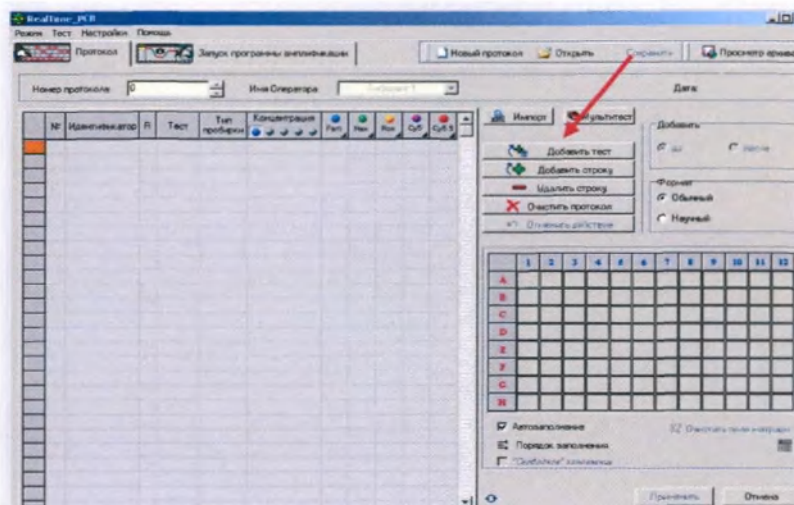
7.3.5 Выберите тесты для копирования. Нажмите кнопку , после чего выбранные тесты появятся в правой половине окна. Теперь с тестом «DQA1» может работать оператор, для которого был скопирован тест.



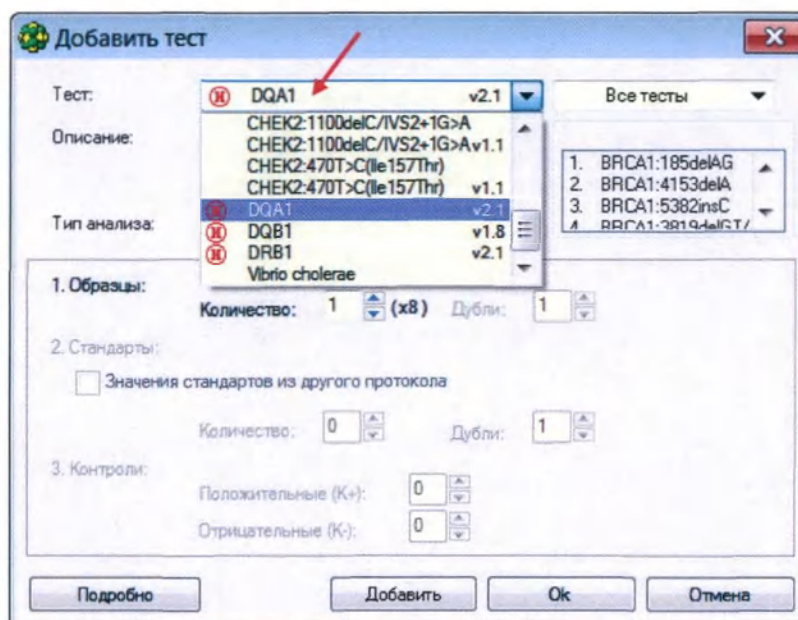
7.4 Ежедневная работа с тестом «DQA1»

7.4.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, для которого копировали тест (см. п.7.3.4), выберите режим «Работа с прибором».

7.4.2 Нажмите кнопку «Добавить тест»



7.4.3 Выберите из списка тест "DQA1"



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.

RealTime_PCR

Режим Тест Настройка Потоки

Протокол Запуск программы амплификации

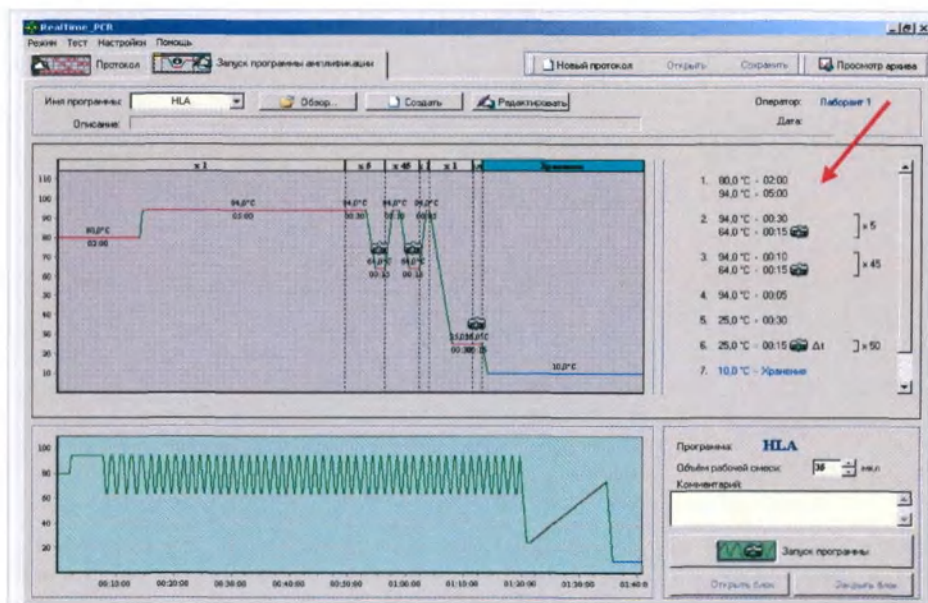
Номер протокола: 0 Имя Оператора: Расширение 1

	№	Идентификатор	Тест	Fam	Hes	Rox	Cy5
A1	1	Образец_1	DQA1	0301	0501	0201	ВК
A2	2		-	-	-	0401, 0601	ВК
A3	3		-	-	-	0101, 0102, 0103	ВК
A4	4		-	-	-	0103, 0102, 0101	ВК
A5	5	Образец_2	DQA1	0301	0501	0201	ВК
A6	6		-	-	-	0401, 0601	ВК
A7	7		-	-	-	0101, 0102, 0103	ВК
A8	8		-	-	-	0103, 0102, 0101	ВК
A9	9	Образец_3	DQA1	0301	0501	0201	ВК
A10	10		-	-	-	0401, 0601	ВК
A11	11		-	-	-	0101, 0102, 0103	ВК
A12	12		-	-	-	0103, 0102, 0101	ВК
B1	13	Образец_4	DQA1	0301	0501	0201	ВК

7.4.6 Отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (при необходимости нажмите кнопки «Очистить поле матрицы» - Очистить поле матрицы и «Порядок заполнения» -).

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.

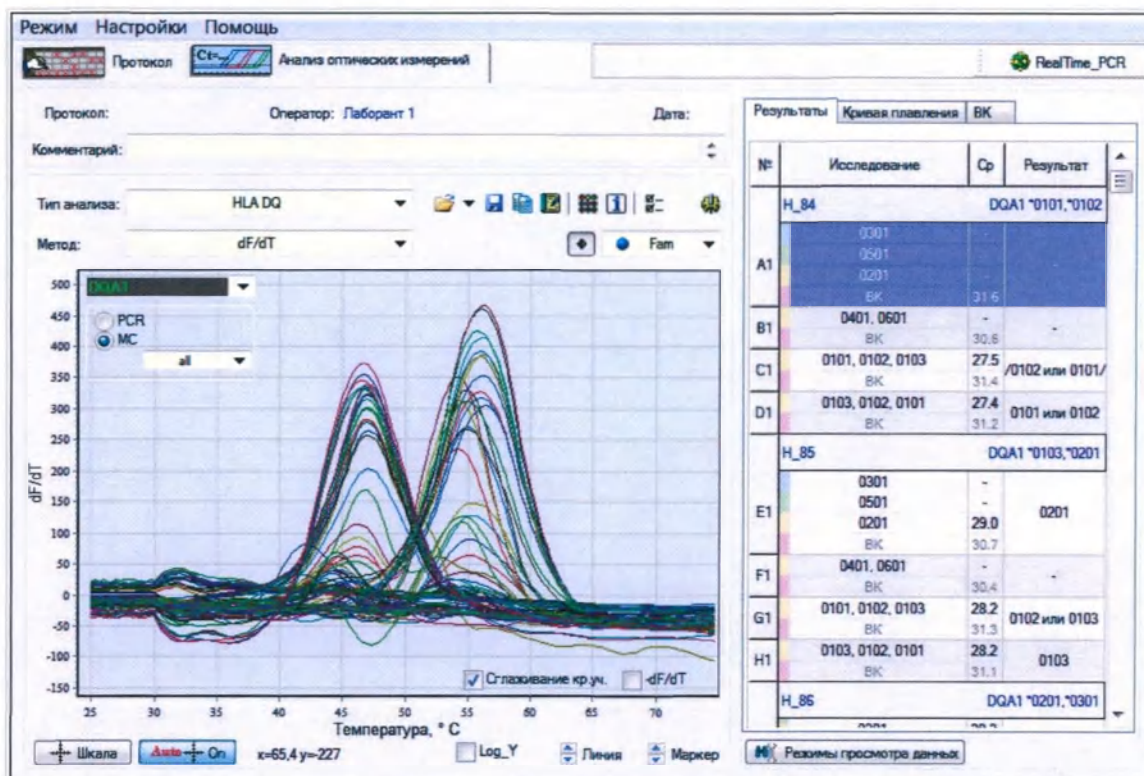
Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора, см. п. 7.3.1).

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

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

8.2 На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла (режим PCR) или от температуры плавления (режим MC) для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторный цикл (Cp) для специфического продукта и ВК, результат по каждому образцу (качественный анализ или анализ кривых плавления для каждой пробирки и генотип для образца). По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчет.

Примеры выдачи результатов прибором:



9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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

9.2 Специфичности гена HLA DQA1 для каждого образца вычисляются программным обеспечением автоматически с учетом результатов по каждой пробирке для этого образца.

9.3 Результат по каждой амплификационной пробирке данного образца не является генотипом образца. Результат генотипирования указан в верхней графе таблицы справа рядом с идентификатором образца. Так, на приведенном примере для образца B50 определен итоговый результат генотипирования: DQA1*0102, *0201.

Результаты		Кривая плавления	
N:	Исследование	Ср	Результат
B50			DQA1 *0102,*0201
A11	0301		
	0501	-	
	0201	28.9	0201
	ВК	29.7	
B11	0401, 0601	-	
	ВК	29.3	
C11	0101, 0102, 0103	27.2	0102 или 0103
	ВК	29.1	
D11	0103, 0102, 0101	27.1	0101 или 0102
	ВК	29.2	

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 либо повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

9.6 Для отрицательных и положительных контрольных образцов должны быть получены результаты, указанные в таблице 4.

Таблица 4

Идентификатор образца	№ пробирки	Результат по специфике			Результат по ВК	Плавнение	Результат генотипирования
		Fam	Hex	Rox	Cy5		
K-	DQA1-1	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср указан ВК	-	-
	DQA1-2	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
	DQA1-3	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
	DQA1-4	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
K+ DQ FAM	DQA1-1	Ср указан 0301	Ср указан 0501	Ср указан 0201	Ср указан ВК	-	?
	DQA1-2	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0401	
	DQA1-3	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0101	
	DQA1-4	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0101 или 0102	
K+ DQ HEX	DQA1-1	Ср указан 0301	Ср указан 0501	Ср указан 0201	Ср указан ВК	-	?
	DQA1-2	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0601	
	DQA1-3	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0102 или 0103	
	DQA1-4	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0103	

9.7 При получении для положительных контрольных образцов отрицательных значений, не указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.8 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

10.1 Транспортирование

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

10.1.2 Допускается транспортировка комплекта реагентов на льду не более 72 часов.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Комплект реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ, следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках в течение всего срока годности комплекта.

10.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в морозильных камерах в течение всего срока годности комплекта.

10.2.3 Смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности комплекта.

10.2.4 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 утвержденной инструкции по применению.

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

- при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности комплекта, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ;

- полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности комплекта;

- смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С 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 DQA1, 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:

ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская область, г. Протвино,
ул. Железнодорожная, д. 20

Место производства:

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

1. ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская область,
г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20

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

Приложение А

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

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 27
(двадцать семь) листа (ов)
специалист по регистрации
Лазарев А.М. Лазарев



Организация-производитель

Организация-разработчик

СОГЛАСОВАНО

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «НПО ДНК-Технология»Генеральный директор
ООО «НПО ДНК-Технология»

В.Ю. Дмитриевский

С.П. Левичев

« 12 » _____ 2022 г.

« 12 » _____ 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**Набор реагентов для типирования генов****гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК****(HLA-ДНК-ТЕХ)****Комплект реагентов для типирования гена DQB1**

REF

R1-H003-N3/5

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор
ООО «ДНК-Технология ТС»

С.А. Самарин

« 12 » _____ 2022 г.

2022 г.

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-DQB1 относится к генам гистосовместимости человека (HLA) II класса, обладает экстремальным полиморфизмом. Известно более 900 аллелей данного гена, сгруппированных в 12 групп аллелей DQB1 (DQB1*02, *0301, *0302, *0303, *0304, *0305, *0401/0402, *0501, *0502/0504, *0503, *0601, *0602-8). Генотипирование по локусу DQB1 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.

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 DQB1 входящий в состав набора реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК (HLA-ДНК-ТЕХ).

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.

Полученные результаты могут быть использованы для подбора гистосовместимого донора при трансплантации органов и тканей, для генетического прогнозирования иммуноопосредованных заболеваний и нарушений репродукции.

1.3 Комплект реагентов для типирования гена DQB1 предназначен для одновременного определения 12 групп аллелей гена DQB1 главного комплекса тканевой совместимости человека.

1.4 В качестве биологического материала используют периферическую кровь.

1.5 Комплект может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 Состав комплекта

Комплект реагентов для типирования гена DQB1 выпускается в универсальной фасовке (маркируется – фасовка U) и включает следующие компоненты:

- Смеси для амплификации:
 - DQB1-1 – 1 пробирка (480 мкл);
 - DQB1-2 – 1 пробирка (480 мкл);
 - DQB1-3 – 1 пробирка (480 мкл);
 - DQB1-4 – 1 пробирка (480 мкл);
 - DQB1-5 – 1 пробирка (480 мкл);
 - DQB1-6 – 1 пробирка (480 мкл);
- Полимеразу ТехноТaq МАХ – 1 пробирка (72 мкл);
- ПЦР-буфер – 1 пробирка (1,44 мл);
- Минеральное масло – 1 пробирка (2,88 мл);
- Положительный контрольный образец ("K+ DQ FAM") – 1 пробирка (100 мкл);
- Положительный контрольный образец ("K+ DQ HEX") – 1 пробирка (100 мкл).

2.2 Число 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 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 Таq-полимеразой.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного 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.

В некоторые смеси для амплификации введены сигнальные зонды, содержащие флуоресцентные метки Fam и Hex. После окончания ПЦР проводится раунд температурного плавления дуплексов, образованных ампликонами и сигнальными зондами, в результате чего изменяется уровень флуоресценции, который фиксируется и представляется программным обеспечением прибора в виде графика. Если сигнальный зонд частично комплементарен ДНК-мишени, температура плавления такого дуплекса будет ниже температуры плавления дуплекса в случае полной комплементарности зонда. На основании совокупных данных о пороговых циклах амплификации и температуры плавления сигнальных зондов проводится интерпретация результатов анализа.

Комплект реагентов для типирования генов DQB1 включает смеси для амплификации, специфичные для 12 групп аллелей гена DQB1 (DQB1*02, *0301, *0302, *0303, *0304, *0305, *0401/0402, *0501, *0502/0504, *0503, *0601, *0602-8), в состав которых в том числе входит внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции специфичностей гена DQB1, включены флуоресцентные метки Fam, Hex и Rox. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации внутреннего контрольного образца (ВК), входит флуоресцентный краситель Cy5 (таблица 1). 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 DQB1 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»): ДТпрайм, ДТлайт и ДТ-96 с программным обеспечением.

Для контроля качества проведения исследования используют контрольные образцы "К+ DQ FAM" и "К+ DQ HEX", представляющий собой смеси клонированных участков генов HLA-DQA1 и HLA-DQB1, выявляемых с применением комплекта.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Наименование смеси для амплификации	Каналы детекции аллельных вариантов и внутреннего контроля				
	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
DQB1-1	03	0401/4042	02	ВК	-
DQB1-2	05	0601	0602-8	ВК	-
DQB1-3	-	-	0302 или 0303	ВК	-
DQB1-4	-	-	0301 или 0304	ВК	-
DQB1-5	0305 или 0401/4042	-	-	ВК	-
DQB1-6	0501	0503	0502/0504	ВК	-

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 DQB1 выявляет следующие группы аллелей гена HLA-DQB1: (DQB1*02, *0301, *0302, *0303, *0304, *0305, *0401/0402, *0501, *0502/0504, *0503, *0601, *0602-8). Перечень определяемых аллелей приведен в таблице 2.

Таблица 2 – Обозначение аллелей и групп аллелей

Обозначение аллеля/группы аллелей	Аллели, входящие в группу ¹	
	Названия аллелей согласно номенклатуре HLA, принятой до 1 апреля 2010 г.	Названия аллелей согласно номенклатуре HLA, принятой с 1 апреля 2010 г.
DQB1*02	*0201-*0248	*02:01-*02:48
DQB1*0301	*0301/*0309...	*03:01/*03:09...
DQB1*0302	*0302/*0307/*0308...	*03:02/*03:07/*03:08...
DQB1*0303	*0303/*0306...	*03:03/*03:06...
DQB1*0304	*0304...	*03:04...
DQB1*0305	*0305...	*03:05...
DQB1*0401/*0402	*0401/*0402/*0404-*0425N	*04:01/*04:02/*04:04-*04:25N
DQB1*0501	*0501/*0507/*0511/*0512/*0518...	*05:01/*05:07/*05:11/*05:12/*05:18...
DQB1*0502/*0504	*0502/*0504/*0505/*0514/*0517...	*05:02/*05:04/*05:05/*05:14/*05:17...
DQB1*0503	*0503/*0506/*0508-*0510/*0513...	*05:03/*05:06/*05:08-*05:10/*05:13...
DQB1*0601	*0601...	*06:01...
DQB1*0602-8	*0602-*0610...	*06:02-*06:10...

¹ - полный список аллелей входящих в группу предоставляется по запросу

В образцах биологического материала человека после завершения реакции амплификации программное обеспечение для приборов ДТлайт², ДТпрайм³ 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. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу комплекта.

Для оценки количества выделенной ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени (КВМ) производства ООО «НПО ДНК-Технология».

При использовании комплекта реагентов для типирования гена DQB1 совместно с комплектом реагентов для типирования гена DRB1 можно учитывать результаты определения КВМ, полученные при использовании комплекта реагентов для типирования DRB1. Если полученное для КВМ значение Ср более 32, оператор должен трактовать это как недостаточное для анализа количество ДНК.

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

² только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2.

³ 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», 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 клинико-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 клинико-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;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объемом 1,5 мл;
- пробирки одноразовые пластиковые объемом 0,2 мл для амплификации или стрипованные пробирки (стрипы) объемом 0,2 мл для амплификации;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объема одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,5 до 10,0 мкл, от 2 до 20 мкл, от 10 до 100 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 ДНКа 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, рекомендуемая версия 7.7.5.44
- ini файл с параметрами анализа.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материалы 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 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.

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

7.2.1 Промаркируйте по 6 пробирок для амплификации объемом 0,2 мл для каждого анализируемого образца и отрицательного контрольного образца («К-»), положительного контрольного образца «К+ DQ FAM» и положительного контрольного образца «К+ DQ HEX».

Например, необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 30 пробирок для исследуемых образцов и 18 пробирок для «К-», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX». Общее количество пробирок – 48.

7.2.2 Встряхните пробирки со смесями для амплификации в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Внесите в промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации (соответственно маркировке в пробирку 1 внесите смесь

DQB1-1, в пробирку 2 – смесь DQB1-2 и т.д.).

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

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

7.2.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq МАХ. Смешайте в отдельной пробирке:

10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,

0,5 x (N+1) мкл полимеразы ТехноТaq МАХ,

где N – количество промаркированных пробирок с учётом «K–», «K+ DQ FAM» и «K+ DQ HEX».

Например, необходимо проанализировать 5 образцов, «K–», «K+ DQ FAM» и «K+ DQ HEX». Промаркированных пробирок – 48. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ для 49 (48+1) пробирок, т.е. 490 мкл ПЦР-буфера + 24,5 мкл полимеразы ТехноТaq МАХ.

7.2.6 Встряхните пробирку в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

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

7.2.7 Добавьте в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ в пробирки со смесями для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить пп. 7.2.8 – 7.2.13.

7.2.8 Добавьте в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.

7.2.9 Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (6 шт. для каждого образца) по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. Для

предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.10 Внесите в пробирки, маркированные «К–», по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК. Внесите в пробирки, маркированные «К+ DQ FAM», по 5,0 мкл положительного контрольного образца «К+ DQ FAM». Внесите в пробирки, маркированные «К+ DQ HEX», по 5,0 мкл положительного контрольного образца «К+ DQ HEX».

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

7.2.12 Установите все пробирки в термоблок амплификатора детектирующего. Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.

7.2.13 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 «DQB1», 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. При выборе теста «DQB1» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 3.

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Δt , °C	Тип блока
1	80	2	00	1			Цикл
	94	5	00				
2	94	0	30	5			Цикл
	64	0	15		√		
3	94	0	5	45			Цикл
	64	0	15		√		
4	25	0	30	1			Цикл
5*	25	0	15	50	√	1,0	«Кривая плавления», $\Delta t=1$ °C; $T_{кон}=75$ °C
6	10	...	...	хранение			хранение

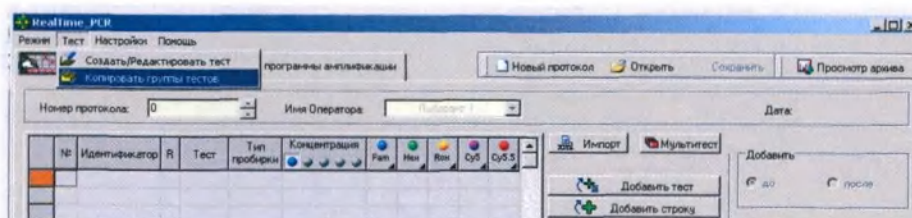
* При создании блока 5 отметить тип "Кривая плавления".

7.3 Загрузка теста «DQB1» для амплификаторов детектирующих при первой постановке на данном компьютере

Тест «DQB1» (файл «HLA.ini») для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 предоставляется производителем комплекта.

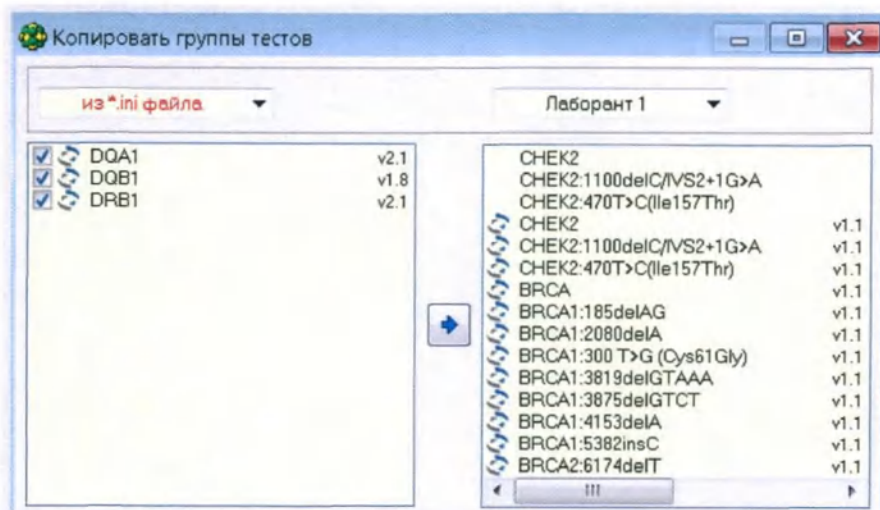
7.3.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с комплектом реагентов для типирования гена DQB1, выберите режим «Работа с прибором». При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.

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

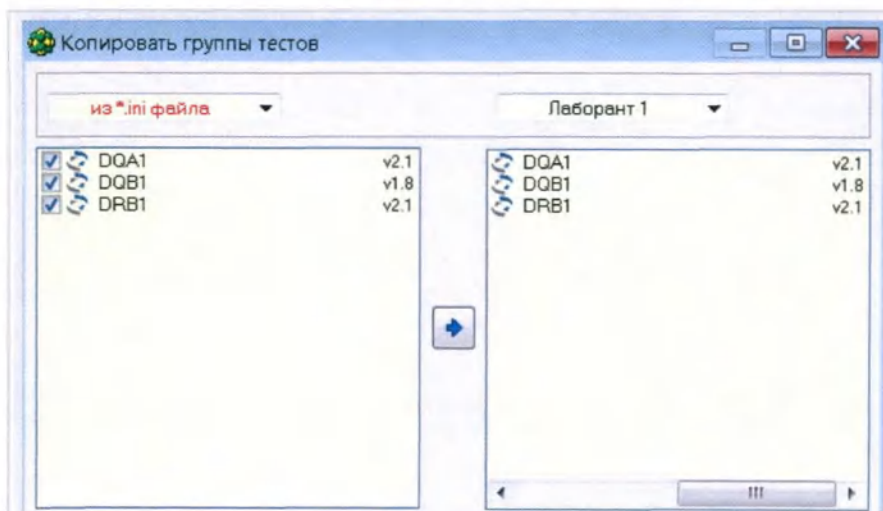


7.3.3 В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл «HLA»

7.3.4 В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которого необходимо скопировать тест «DQB1».



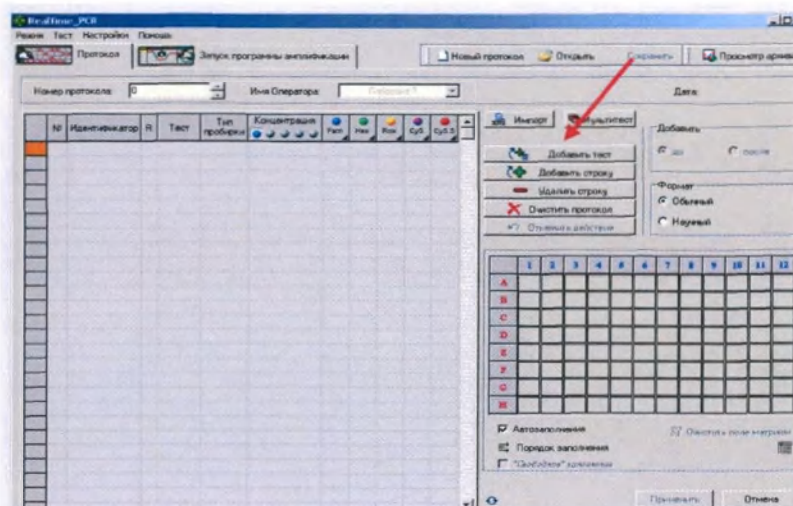
7.3.5 Выберите тесты для копирования. Нажмите кнопку , после чего выбранные тесты появятся в правой половине окна. Теперь с тестом «DQB1» может работать оператор, для которого был скопирован тест.



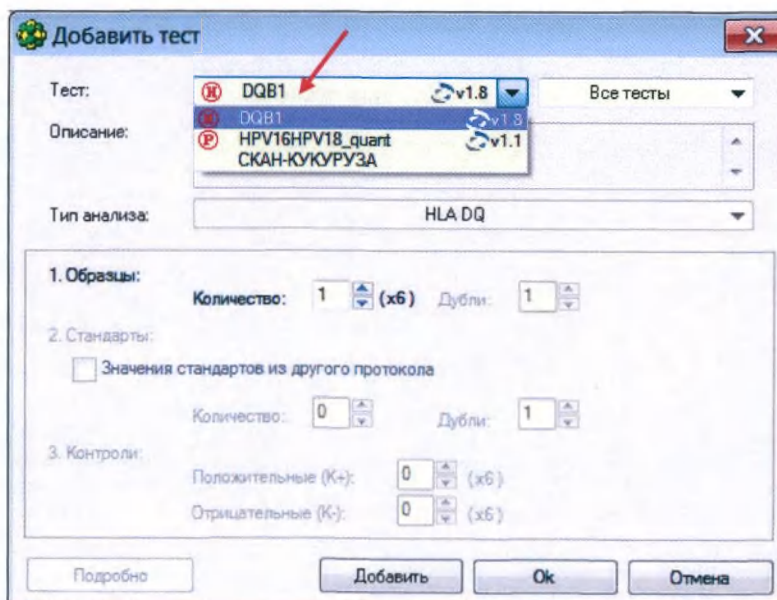
7.4 Ежедневная работа с тестом «DQB1»

7.4.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, для которого копировали тест (см. п.7.3.4), выберите режим «Работа с прибором».

7.4.2 Нажмите кнопку «Добавить тест»



7.4.3 Выберите из списка тест "DQB1"



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.

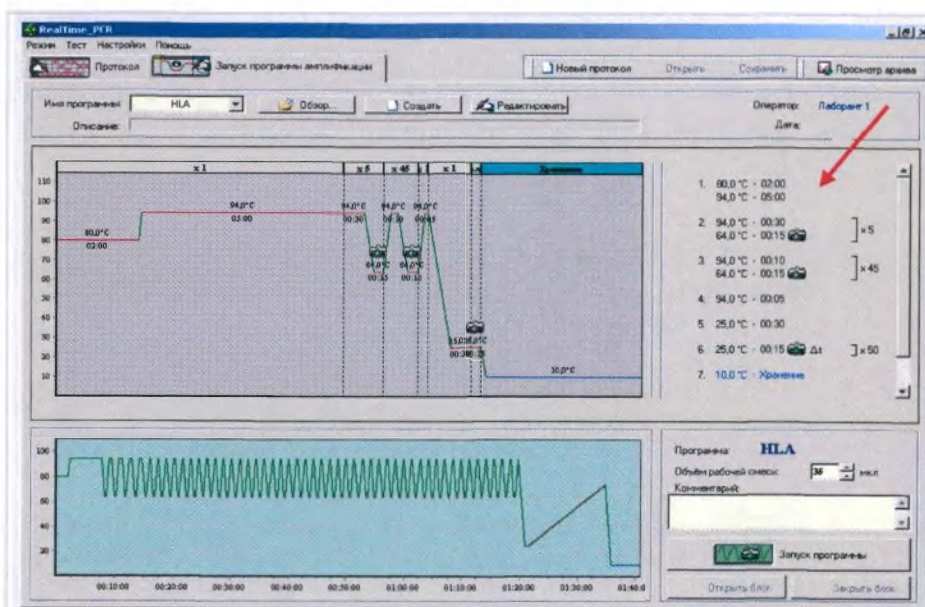
№	Идентификатор	Тест	Fam	Нек	Рок	Сy5
A1	1	Образец_1	DQB1	03	0401/0402	02
A2	2			05	0601	0602-8
A3	3			-	-	0302 или 0303
A4	4			-	-	0301 или 0304
A5	5					0305 или 0401/0402

7.4.6 Отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (при необходимости нажмите кнопки «Очистить поле матрицы» -  Очистить поле матрицы и «Порядок заполнения» - ).

№	Идентификатор	Тест	Fam	Нек	Рок	Сy5
A1	1	Образец_1	DQB1	03	0401/0402	02
B1	2			05	0601	0602-8
C1	3			-	-	0302 или 0303
D1	4			-	-	0301 или 0304
E1	5					0305 или 0401/0402
F1	6			0501	0503	0502/0504
G1	7	Образец_2	DQB1	03	0401/0402	02
H1	8			05	0601	0602-8
A2	9			-	-	0302 или 0303
B2	10			-	-	0301 или 0304
C2	11					0305 или 0401/0402
D2	12			0501	0503	0502/0504
E2	13	Образец_3	DQB1	03	0401/0402	02
F2	14			05	0601	0602-8
G2	15			-	-	0302 или 0303
H2	16					0301 или 0304

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.

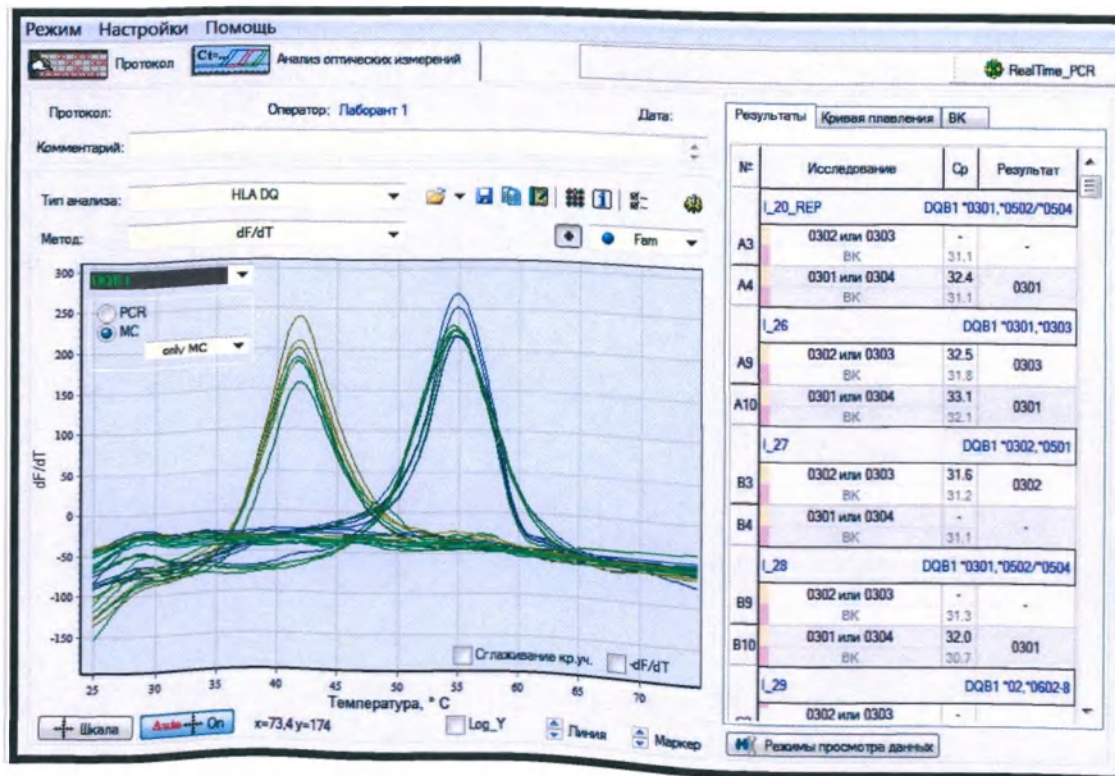
Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора, см. п. 7.3.1).

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

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

8.2 На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла (режим PCR) или от температуры плавления (режим MC) для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторный цикл (Cp) для специфического продукта и ВК, результат по каждому образцу (качественный анализ или анализ кривых плавления для каждой пробирки и генотип для образца). По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчет.

Примеры выдачи результатов прибором:



9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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

9.2 Специфичности гена HLA DQB1 для каждого образца вычисляются программным обеспечением автоматически с учетом результатов по каждой пробирке для этого образца.

9.3 Результат по каждой амплификационной пробирке данного образца не является генотипом образца. Результат генотипирования указан в верхней графе таблицы справа рядом с идентификатором образца. Так, на приведенном примере для образца С03 определен итоговый результат генотипирования: DQB1*0302,*0602-8.

Результаты Кривая плавления			
№	Исследование	Ср	Результат
C03	03	32.6	DQB1 *0302,*0602-8
	0401/0402	-	
	02	-	
	ВК	32.6	
B1	05	-	0602-8
	0601	-	
	0602-8	30.9	
	ВК	29.7	
C1	0302 или 0303	33.1	0302
	ВК	29.9	
D1	0301 или 0304	-	-
	ВК	30.1	
E1	0305 или 0401/0402	-	-
	ВК	30.0	
F1	0501	-	-
	0503	-	
	0502/0504	-	
	ВК	30.1	

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 либо повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

9.6 Для отрицательных и положительных контрольных образцов должны быть получены результаты, указанные в таблице 4.

Таблица 4

Идентификатор образца	№ пробирки	Результат по специфике			Результат по ВК	Плавнение	Результат генотипирования
		Fam	Hex	Rox	Cy5		
K-	DQB1-1	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср указан ВК	-	-
	DQB1-2	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср указан ВК	-	
	DQB1-3	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
	DQB1-4	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
	DQB1-5	Ср не указан	-	-	Ср указан ВК	-	
	DQB1-6	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср указан ВК	-	
K+ DQ FAM	DQB1-1	Ср указан 03	Ср указан 0401/0402	Ср указан 02	Ср указан ВК	-	?
	DQB1-2	Ср указан 05	Ср указан 0601	Ср указан 0602-8	Ср указан ВК	-	
	DQB1-3	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0302	
	DQB1-4	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0304	
	DQB1-5	Ср указан 0305 или 0401/0402	-	-	Ср указан ВК	-	
	DQB1-6	Ср указан 0501	Ср указан 0503	Ср указан 0502/0504	Ср указан ВК	-	
K+ DQ HEX	DQB1-1	Ср указан 03	Ср указан 0401/0402	Ср указан 02	Ср указан ВК	-	?
	DQB1-2	Ср указан 05	Ср указан 0601	Ср указан 0602-8	Ср указан ВК	-	
	DQB1-3	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0302,0303	
	DQB1-4	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0301	
	DQB1-5	Ср указан 0305 или 0401/0402	-	-	Ср указан ВК	-	
	DQB1-6	Ср указан 0501	Ср указан 0503	Ср указан 0502/0504	Ср указан ВК	-	

9.7 При получении для положительных контрольных образцов отрицательных значений, не указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.8 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

10.1 Транспортирование

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

10.1.2 Допускается транспортировка комплекта реагентов на льду не более 72 часов.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Комплект реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ, следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках в течение всего срока годности комплекта.

10.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в морозильных камерах в течение всего срока годности комплекта.

10.2.3 Смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности комплекта.

10.2.4 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 утвержденной инструкции по применению.

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

- при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности комплекта, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ;

- полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности комплекта;

- смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С 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 DQB1, 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:

ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская область, г. Протвино,
ул. Железнодорожная, д. 20

Место производства:

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

1. ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская область,
г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20

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

Приложение А

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

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 27

(двадцать семь) листа (ов)

специалист по регистрации

Лазарев А.М.

Лазарев



МАКЕТ ПАСПОРТА!!!



ООО «НПО ДНК-Технология»

Паспорт качества № XXXXXX

Набор реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA)

II класса методом амплификации ДНК
HLA-ДНК-ТЕХ

Комплект реагентов для типирования гена DRB1, DQA1, DQB1

Фасовка: А
Номер серии: XXXXXX-XX
Дата изготовления: XXXX-XX-XX
Срок годности: до XXXX-XX-XX*

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016.
2. Проверка состава набора и внешнего вида компонентов

Компонент	Количество	Характеристика и норма	Условия хранения и транспортирования	Результат
Смеси для амплификации Стрим	тройной стрип 24 пробирки	Прозрачная голубая или бесцветная / светло-розовая жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
ПЦР-буфер Стрим	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Буфер для разведения ДНК	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DRB1"	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DQ FAM"	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DQ HEX"	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Полимераза ТехноTaq MAX	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от минус 18 °С до минус 22 °С	Соответствует
Стрипы по 8 пробирок	10 шт.	-	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Крышки для стрипов	3 шт.	-	от 2 °С до 8 °С	Соответствует

3. Проверка функциональных показателей

Компонент	Характеристика и норма	Результат
Аналитическая чувствительность	Не более 1,0 нг	Соответствует
Аналитическая специфичность	Определение соответствующего результата генотипирования при анализе соответствующего лабораторного контрольного образца Определение отрицательного результата при тестировании отрицательного контрольного образца	Соответствует

Заключение ОТК: соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016
Дата выдачи паспорта: XXXX-XX-XX

*Срок годности в соответствии с требованиями ТУ 9398-411-46482062-2016

КОПИЯ
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ
000*НПО ДНК
ДМИТРОВСКИЙ
ПОДПИСЬ

ДИРЕКТОР
Научно-производственное
объединение
ДНК-Технология

МАКЕТ ПАСПОРТА!!!



ООО «НПО ДНК-Технология»

Паспорт качества № XXXXXX

Набор реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA)
II класса методом амплификации ДНК
HLA-ДНК-ТЕХ

Комплект реагентов для типирования гена DRB1
HLA-DRB1

Фасовка: S
Номер серии: XXXXXX-XX
Дата изготовления: XXXX-XX-XX
Срок годности: до XXXX-XX-XX*

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016.
2. Проверка состава набора и внешнего вида компонентов

Компонент	Количество	Характеристика и норма	Условия хранения и транспортирования	Результат
Смеси для амплификации, запечатанные парафином, Стрип А	24 стрипа по 8 пробирок	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость, под белым воскообразным слоем	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Смеси для амплификации, запечатанные парафином, Стрип В	24 стрипа по 8 пробирок	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость, под голубым воскообразным слоем	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Раствор Таq-полимеразы	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Минеральное масло	1 флакон	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DRB1"	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Крышки для стрипов	48 шт.	-	от 2 °С до 8 °С	Соответствует

3. Проверка функциональных показателей

Компонент	Характеристика и норма	Результат
Аналитическая чувствительность	Не более 1,0 нг	Соответствует
Аналитическая специфичность	Определение соответствующего результата генотипирования при анализе соответствующего лабораторного контрольного образца	Соответствует
	Определение отрицательного результата при тестировании отрицательного контрольного образца	

Заключение ОТК: соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016

Дата выдачи паспорта: XXXX-XX-XX

*Срок годности в соответствии с требованиями ТУ 9398-411-46482062-2016

КОПИЯ
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ
000 «НПО
ДМИТРИЙ
ПОДПИСЬ



МАКЕТ ПАСПОРТА!!!



ООО «НПО ДНК-Технология»

Паспорт качества № XXXXXX

Набор реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA)

II класса методом амплификации ДНК
HLA-ДНК-ТЕХ

Комплект реагентов для типирования гена DQA1
HLA-DQA1

Фасовка:

U

Номер серии:

XXXXXX-XX

Дата изготовления

XXXX-XX-XX

Срок годности:

до XXXX-XX-XX*

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016.

2. Проверка состава набора и внешнего вида компонентов

Компонент	Количество	Характеристика и норма	Условия хранения и транспортирования	Результат
Смесь для амплификации "DQA1-1"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQA1-2"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQA1-3"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQA1-4"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
ПЦР-буфер	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Минеральное масло	2 пробирки	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DQ FAM"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DQ HEX"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Полимераза ТехноTaq MAX	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от минус 18 °C до минус 22 °C	Соответствует

3. Проверка функциональных показателей

Компонент	Характеристика и норма	Результат
Аналитическая чувствительность	Не более 1,0 нг	Соответствует
Аналитическая специфичность	Определение соответствующего результата генотипирования при анализе соответствующего лабораторного контрольного образца	Соответствует
	Определение отрицательного результата при тестировании отрицательного контрольного образца	

Заключение ОТК: соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016

Дата выдачи паспорта: XXXX-XX-XX

*Срок годности в соответствии с требованиями ТУ 9398-411-46482062-2016

КОПИЯ

ВЕРНА

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ

ДИРЕКТОР

ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ»

ДМИТРОВСКИЙ В.Ю.

МАКЕТ ПАСПОРТА!!!



ООО «НПО ДНК-Технология»

Паспорт качества № XXXXXX

Набор реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA)

II класса методом амплификации ДНК

HLA-ДНК-ТЕХ

Комплект реагентов для типирования гена DQA1

HLA-DQA1

Фасовка:

U

Номер серии:

XXXXXX-XX

Дата изготовления

XXXX-XX-XX

Срок годности:

до XXXX-XX-XX*

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016.
2. Проверка состава набора и внешнего вида компонентов

Компонент	Количество	Характеристика и норма	Условия хранения и транспортирования	Результат
Смесь для амплификации "DQA1-1"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQA1-2"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQA1-3"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQA1-4"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
ПЦР-буфер	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Минеральное масло	2 пробирки	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DQ FAM"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DQ HEX"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Полимераза ТехноTaq MAX	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от минус 18 °C до минус 22 °C	Соответствует

3. Проверка функциональных показателей

Компонент	Характеристика и норма	Результат
Аналитическая чувствительность	Не более 1,0 нг	Соответствует
Аналитическая специфичность	Определение соответствующего результата генотипирования при анализе соответствующего лабораторного контрольного образца Определение отрицательного результата при тестировании отрицательного контрольного образца	Соответствует

Заключение ОТК: соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016

Дата выдачи паспорта: XXXX-XX-XX

*Срок годности в соответствии с требованиями ТУ 9398-411-46482062-2016

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ»
ДМИТРОВСКИЙ В.Ю.

Паспорт качества № XXXXXX

Набор реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA)

II класса методом амплификации ДНК

HLA-ДНК-ТЕХ

Комплект реагентов для типирования гена DQB1

HLA-DQB1

Фасовка:

U

Номер серии:

XXXXXX-XX

Дата изготовления

XXXX-XX-XX

Срок годности:

до XXXX-XX-XX*

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016.
2. Проверка состава набора и внешнего вида компонентов

Компонент	Количество	Характеристика и норма	Условия хранения и транспортирования	Результат
Смесь для амплификации "DQB1-1"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQB1-2"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQB1-3"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQB1-4"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQB1-5"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQB1-6"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
ПЦР-буфер	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Минеральное масло	1 флакон	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DQ FAM"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DQ HEX"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Полимераза ТехноТақ МАХ	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от минус 18 °C до минус 22 °C	Соответствует

3. Проверка функциональных показателей

Компонент	Характеристика и норма	Результат
Аналитическая чувствительность	Не более 1,0 нг	Соответствует
Аналитическая специфичность	Определение соответствующего результата генотипирования при анализе соответствующего операторного контрольного образца Определение отрицательного результата при тестировании отрицательного контрольного образца	Соответствует

Заключение ОТК: соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016

Дата выдачи паспорта: XXXX-XX-XX

*Срок годности в соответствии с требованиями ТУ 9398-411-46482062-2016

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 4

(четыре) листа (ов)

специалист по регистрации

Лазарев А.М.



Паспорт качества № XXXXXX

Набор реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA)
II класса методом амплификации ДНК
HLA-ДНК-ТЕХ

Комплект реагентов для типирования гена DRB1, DQA1, DQB1

Фасовка: А
Номер серии: XXXXXX-XX
Дата изготовления: XXXX-XX-XX
Срок годности: до XXXX-XX-XX*

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016.
2. Проверка состава набора и внешнего вида компонентов

Компонент	Количество	Характеристика и норма	Условия хранения и транспортирования	Результат
Смеси для амплификации Стрим	тройной стрип 24 пробирки	Прозрачная голубая или бесцветная / светло-розовая жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
ПЦР-буфер Стрим	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Буфер для разведения ДНК	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DRB1"	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DQ FAM"	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DQ HEX"	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Полимераза ТехноTaq MAX	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от минус 18 °С до минус 22 °С	Соответствует
Стрипы по 8 пробирок	10 шт.	-	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Крышки для стрипов	3 шт.	-	от 2 °С до 8 °С	Соответствует

3. Проверка функциональных показателей

Компонент	Характеристика и норма	Результат
Аналитическая чувствительность	Не более 1,0 нг	Соответствует
Аналитическая специфичность	Определение соответствующего результата генотипирования при анализе соответствующего лабораторного контрольного образца	Соответствует
	Определение отрицательного результата при тестировании отрицательного контрольного образца	

Заключение ОТК: соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016

Дата выдачи паспорта: XXXX-XX-XX

*Срок годности в соответствии с требованиями ТУ 9398-411-46482062-2016



МАКЕТ ПАСПОРТА!!!



ООО «ДНК-Технология ТС»

Паспорт качества № XXXXXX

Набор реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA)
II класса методом амплификации ДНК
HLA-ДНК-ТЕХ

Комплект реагентов для типирования гена DRB1
HLA-DRB1

Фасовка: S
Номер серии: XXXXXX-XX
Дата изготовления: XXXX-XX-XX
Срок годности: до XXXX-XX-XX*

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016.
2. Проверка состава набора и внешнего вида компонентов

Компонент	Количество	Характеристика и норма	Условия хранения и транспортирования	Результат
Смеси для амплификации, запечатанные парафином, Стрип А	24 стрипа по 8 пробирок	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость, под белым воскообразным слоем	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Смеси для амплификации, запечатанные парафином, Стрип В	24 стрипа по 8 пробирок	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость, под голубым воскообразным слоем	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Раствор Таq-полимеразы	4 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Минеральное масло	1 флакон	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DRB1"	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Крышки для стрипов	48 шт.	-	от 2 °С до 8 °С	Соответствует

3. Проверка функциональных показателей

Компонент	Характеристика и норма	Результат
Аналитическая чувствительность	Не более 1,0 нг	Соответствует
Аналитическая специфичность	Определение соответствующего результата генотипирования при анализе соответствующего лабораторного контрольного образца	Соответствует
	Определение отрицательного результата при тестировании отрицательного контрольного образца	

Заключение ОТК: соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016
Дата выдачи паспорта: XXXX-XX-XX

*Срок годности в соответствии с требованиями ТУ 9398-411-46482062-2016

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «ДНК-Технология ТС»
САМАРИН С.А.
подпись
«DNA-Technology TS»
LLC



МАКЕТ ПАСПОРТА!!!



ООО «ДНК-Технология ТС»

Паспорт качества № XXXXXX

Набор реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA)

II класса методом амплификации ДНК

HLA-ДНК-ТЕХ

Комплект реагентов для типирования гена DQA1

HLA-DQA1

Фасовка:

U

Номер серии:

XXXXXX-XX

Дата изготовления

XXXX-XX-XX

Срок годности:

до XXXX-XX-XX*

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016.

2. Проверка состава набора и внешнего вида компонентов

Компонент	Количество	Характеристика и норма	Условия хранения и транспортирования	Результат
Смесь для амплификации "DQA1-1"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Смесь для амплификации "DQA1-2"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Смесь для амплификации "DQA1-3"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Смесь для амплификации "DQA1-4"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
ПЦР-буфер	2 пробирки	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Минеральное масло	2 пробирки	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DQ FAM"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DQ HEX"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °С до 8 °С	Соответствует
Полимераза ТехноТақ МАХ	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от минус 18 °С до минус 22 °С	Соответствует

3. Проверка функциональных показателей

Компонент	Характеристика и норма	Результат
Аналитическая чувствительность	Не более 1,0 нг	Соответствует
Аналитическая специфичность	Определение соответствующего результата генотипирования при анализе соответствующего лабораторного контрольного образца	Соответствует
	Определение отрицательного результата при тестировании отрицательного контрольного образца	

Заключение ОТК: соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016

Дата выдачи паспорта: XXXX-XX-XX

*Срок годности в соответствии с требованиями ТУ 9398-411-46482062-2016

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ ТС»
САМАРИН С.А. И.О.

Паспорт качества № XXXXXX

Набор реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA)

II класса методом амплификации ДНК

HLA-ДНК-ТЕХ

Комплект реагентов для типирования гена DQB1

HLA-DQB1

Фасовка:

U

Номер серии:

XXXXXX-XX

Дата изготовления

XXXX-XX-XX

Срок годности:

до XXXX-XX-XX*

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016.

2. Проверка состава набора и внешнего вида компонентов

Компонент	Количество	Характеристика и норма	Условия хранения и транспортирования	Результат
Смесь для амплификации "DQB1-1"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQB1-2"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQB1-3"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQB1-4"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQB1-5"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Смесь для амплификации "DQB1-6"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
ПЦР-буфер	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Минеральное масло	1 флакон	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DQ FAM"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Положительный контрольный образец "K+ DQ HEX"	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от 2 °C до 8 °C	Соответствует
Полимераза ТехноTaq MAX	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	от минус 18 °C до минус 22 °C	Соответствует

3. Проверка функциональных показателей

Компонент	Характеристика и норма	Результат
Аналитическая чувствительность	Не более 1,0 нг	Соответствует
Аналитическая специфичность	Определение соответствующего результата генотипирования при анализе соответствующего лабораторного контрольного образца	Соответствует
	Определение отрицательного результата при тестировании отрицательного контрольного образца	

Заключение ОТК: соответствует требованиям ТУ 9398-411-46482062-2016

Дата выдачи паспорта: XXXX-XX-XX

*Срок годности в соответствии с требованиями ТУ 9398-411-46482062-2016

КОПИЯ
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ ТС»
САМАРИН С.А.





Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 4

(четыре) листа (ов)

специалист по регистрации
Лазарев А.М.

Лазарев