

ІНСТРУКЦІЯ

із застосування набору реагентів
для виявлення алеля 27 локусу В
головного комплексу гістосумісності людини
методом ПЛР в режимі реального часу

HLA-B27

Варіанти фасування:

фасування S

пробірки  R1-H004-23/4UA

стрипи  R1-H004-S3/4UA

фасування U  R1-H004-N3/4UA

УВАГА! Вивчіть інструкцію перед початком роботи

ЗМІСТ

ВСТУП	2
1 ПРИЗНАЧЕННЯ	3
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРУ	4
2.1 Склад набору.....	4
2.2 Число аналізованих проб	4
2.3 Принцип методу дослідження.....	4
2.4 Час проведення аналізу	5
3 АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ	5
3.1 Специфічність аналізу	5
3.2 Чутливість аналізу.....	6
3.3 Діагностичні характеристики	6
4 ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	6
5 ОБЛАДНАННЯ І МАТЕРІАЛИ	7
6 АНАЛІЗОВАНІ ЗРАЗКИ	8
6.1 Матеріал для дослідження.....	8
6.2 Взяття периферичної крові	8
6.3 Транспортування і зберігання досліджуваного матеріалу	8
7 ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	8
7.1 Виділення ДНК з біологічного матеріалу.....	8
7.2 Підготовка і проведення ПЛР	8
8 РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ АМПЛІФІКАЦІЇ	11
9 ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ РЕАКЦІЇ	12
10 ТРАНСПОРТУВАННЯ, ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЯ	13
10.1 Транспортування.....	13
10.2 Зберігання.....	13
10.3 Вказівки по експлуатації	13
11 РЕКОМЕНДАЦІЇ З УТИЛІЗАЦІЇ	14
12 ГАРАНТІЇ ВИРОБНИКА	14
13 РЕМОНТ І ТЕХНІЧНЕ ОБСЛУГОВУВАННЯ	14
14 СИМВОЛИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ ПРИ МАРКУВАННІ НАБОРУ	15
15 ПЕРЕЛІК ЗАСТОСОВУВАНИХ НАЦІОНАЛЬНИХ СТАНДАРТИВ	15
16 АДРЕСА ДЛЯ ЗВЕРНЕНЬ	16

ВСТУП

HLA-B27 є одним з варіантів молекул головного комплексу тканинної сумісності людини (HLA) I класу, локусу В. Комплекс генів HLA (Human Leukocyte Antigens, антигени лейкоцитів людини) розташований на короткому плечі 6-ї хромосоми, включає кілька десятків генів, що забезпечують функцію імунної відповіді.

Білкові продукти генів HLA I класу (антигени) відіграють ключову роль у підтримці генетичної сталості тканин організму і забезпеченні стійкості людини до інфекцій, переважно вірусних.

У деяких випадках, в силу ряду причин (наприклад, при генетичній схильності, зниженні здатності імунної системи до зворотної регуляції імунних реакцій), нормальна імунна відповідь на деякі мікроорганізми стає патологічною, аутоімунною. Аутоімунна відповідь спрямована проти власних нормальних тканин організму, викликає їх пошкодження і розвиток аутоімунного запалення.

Яскравим прикладом, що демонструє зв'язок генів HLA з розвитком захворювань, є HLA-B27, варіант гена HLA в локусі В. Встановлено, що ця молекула є «маркером» цілого ряду запальних захворювань суглобів, які були об'єднані в групу серонегативних спондилоартритів (ССА).

Захворювання включені в групу ССА, мають спільні патогенетичні механізми і ряд подібних клініко-рентгенологічних ознак:

- серонегативність по ревматоїдного фактору (РФ);
- ураження крижово-клубових зчленувань і хребта;
- асиметричний артрит з переважним ураженням суглобів нижніх кінцівок;
- сімейна схильність до розвитку захворювань;
- тенденція до «клінічних перехресних» ("overlap syndrom") захворювань, що входять в групу.

Особливістю ССА є ураження не тільки опорно-рухового апарату, а й інших органів і систем: очей, шкіри, слизових, серця, аорти, нирок. Різноманіття позасуглобових проявів відображає клінічний поліморфізм ССА і характеризує їх як захворювання з системним типом запалення, при яких патологія суглобів і хребта може в різний час виступати в різних поєднаннях з ураженням інших органів.

До групи ССА входять наступні захворювання:

- Ідіопатичний анкілозуючий спондилоартрит (хвороба Бехтерева);
- Псоріатичний артрит;
- Реактивні артрити (Синдром Рейтера);
- Ентеропатичні артрити (при хворобах Крона, Уіпла, неспецифічний виразковий коліт);
- Гострий передній увеїт;
- Ювенільний спондилоартрит;
- Недиференційовані артропатії.

Асоціація анкілозуючого спондилоартриту (хвороба Бехтерева) з HLA-B27 є прикладом однієї з найбільш сильних генетичних зв'язків комплексу генів HLA з хворобами в області ревматології. Цей генетичний зв'язок був відкритий на початку 70-х років, коли було виявлено, що 90-95% пацієнтів з анкілозивним спондилітом мали HLA-B27, в той час як частота цього гена в загальній популяції становить 8-10%.

В даний час встановлено, що інші хвороби з групи ССА мають різні, але нижчі, ніж для анкілозуючого спондиліту, асоціації з HLA-B27. Частота народження HLA-B27 у дітей з ювенільним спондилоартритом становить 80-90%, у хворих з реактивним артритом 60-90%, у хворих з недиференційованими артропатіями 50-70%, у пацієнтів з псоріатичним артритом і ентеропатичним артритом 50-60%. При цьому частота народження HLA-B27 у пацієнтів з ентеропатичними артритами при наявності периферичних артритів практично не відрізняється від загальнопопуляційної частоти. Збільшення частоти виникнення HLA-B27 спостерігається тільки у пацієнтів при наявності спондиліта/ сакроілеїта.

Виявлення маркера HLA-B27 в комплексі з іншими лабораторними і рентгенологічними дослідженнями істотно підвищує можливості постановки правильного діагнозу і прогнозу захворювань, що відносяться до групи серонегативного спондилоартриту, однак остаточний діагноз може поставити тільки лікар ревматолог на підставі всієї сукупності клініко-рентгено-лабораторно-анамнестичних даних.

Показаннями до призначення аналізу є:

1. Наявність клінічних симптомів спондилоартропатій: запальні болі в спині, асиметричні периферичні олігоартрити, переважно нижніх кінцівок, ентезита і / або тендосиновіти;
2. Як додатковий лабораторний показник з метою прогнозу тяжкості перебігу спондилоартропатій.

1 ПРИЗНАЧЕННЯ

- 1.1 Ця інструкція поширюється на набір реагентів для виявлення алеля 27 локусу В головного комплексу гістосумісності людини методом ПЛР в режимі реального часу (HLA-B27).
- 1.2 Набір реагентів HLA-B27 призначений для виявлення алеля 27 локусу В головного комплексу гістосумісності людини методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу в біологічному матеріалі людини (периферична кров) з використанням детектуючих ампліфікаторов.
- 1.3 Функціональне призначення виробу: Набір реагентів призначений для використання *in vitro* і дозволяє виявити HLA-B27 і визначити схильність до розвитку анкілозуючого спондиліту (хвороба Бехтерева) і ревматоїдного артрити.
- 1.4 Набір може бути використаний в клініко-діагностичних лабораторіях медичних установ і науково-дослідницькій практиці.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРУ

2.1 Склад набору

Набір реагентів HLA-B27 випускається в наступних фасовках: стандартна (маркується - фасування S), універсальна (маркується - фасування U).

До складу набору реагентів входять наступні компоненти:

- 1) Фасовка S, **REF** R1-H004-23/4UA (пробірки);
REF R1-H004-S3/4UA (стрипи)
 - Суміш для ампліфікації, запаяна парафіном - 48 пробірок або 6 стрипів по 8 пробірок (по 20 мкл);
 - Розчин Taq-полімерази - 1 пробірка (500 µl (мкл));
 - Мінеральне масло - 1 пробірка (1,0 ml (мл));
 - Позитивний контрольний зразок - 1 пробірка (75 µl (мкл)).
 - Кришки для стрипів - 6 шт.
- 2) Фасовка U, **REF** R1-H004-N3/4UA (пробірки)
 - Суміш для ампліфікації - 1 пробірка (960 µl (мкл));
 - ПЛР-буфер - 1 пробірка (500 µl (мкл));
 - Полімераза ТехноTaq MAX - 1 пробірка (24 µl (мкл));
 - Мінеральне масло - 1 пробірка (1,0 ml (мл))
 - Позитивний контрольний зразок - 1 пробірка (75 µl (мкл)).

2.2 Кількість аналізованих проб

Набір реагентів стандартного і універсального фасування призначений для одноразового застосування і розрахований на 48 визначень, включаючи аналіз невідомих зразків, позитивних контрольних зразків і негативних контрольних зразків.

2.3 Принцип методу

Метод: Полімеразна ланцюгова реакція з детекцією результатів в режимі реального часу; якісний аналіз.

В основі роботи набору реагентів лежить принцип ампліфікації ДНК методом ПЛР. Процес ампліфікації полягає в серії повторюваних циклів температурної денатурації ДНК, відпалу праймерів комплементарних специфічній ділянці ДНК і подальшої добудови полінуклеотидних ланцюгів з цих праймерів Taq-полімеразою.

Для підвищення чутливості і специфічності реакції передбачено застосування «гарячого старту», який забезпечується методикою приготування реакційної суміші, що складається з двох шарів, розділених прошарком з парафіну. Змішування шарів і перетворення їх в реакційну суміш відбувається тільки після плавлення парафіну, що виключає неспецифічний відпал праймерів на ДНК-мішені при початковому прогріванні пробірки.

У суміш для ампліфікації введені ДНК-зонди, кожен з яких несе флуоресцентну мітку і гаситель флуоресценції. При утворенні специфічного продукту ДНК-зонд руйнується, дія гасителя на флуоресцентну мітку припиняється, що веде до зростання рівня флуоресценції. Кількість зруйнованих зондів (а, отже, і рівень флуоресценції) збільшується пропорційно кількості специфічних ампліконів, що утворилися і вимірюється на кожному циклі ампліфікації.

Набір реагентів включає суміш для ампліфікації, специфічну для алелі HLA-B27 і внутрішнього контролю. В якості внутрішнього контролю використовується контроль взяття матеріалу для системи HLA-B27. Використання внутрішнього контролю дозволяє уникнути помилково негативних результатів в разі недостатньої для аналізу кількості геномної ДНК людини в зразку.

До складу ДНК-зонда, що використовується для детекції продукту ампліфікації HLA-B27, включена флуоресцентна мітка Fam. До складу ДНК-зонда, що використовується для детекції продукту ампліфікації внутрішнього контролю, входить флуоресцентний барвник Hex.

Використання декількох флуоресцентних барвників дозволяє скоротити кількість пробірок, оскільки з'являється можливість одночасно реєструвати результати різних реакцій ампліфікації, що проходять в одній пробірці. У таблиці 1 представлені канали детекції продуктів ампліфікації.

Т а б л и ц я 1 - Канали детекції продуктів ампліфікації

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

Дослідження з використанням набору реагентів складається з наступних етапів: виділення ДНК (пробопідготовка) і ПЛР-ампліфікація ДНК в режимі реального часу. Для проведення ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу використовують ампліфатори детектуючі (ТОВ «НВО ДНК-Технологія») ДТлайт¹, ДТпрайм² або ДТ-96.

2.4 Час проведення аналізу

Від 1,5 годин (без урахування пробопідготовки).

3 АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

3.1 Специфічність аналізу

У зразках біологічного матеріалу людини, що містять алель HLA-B27 в гомозиготному або в гетерозиготному стані, реєструється позитивний результат по каналах Fam і Hex; за умови $Cp\ Hex \leq 32$ і $\Delta Cp = Cp\ (Fam) - Cp\ (Hex)$ менше 8,0.

Для зразків біологічного матеріалу людини, що не містять алель HLA-B27, реєструється або негативний результат по каналу Fam і позитивний по

¹- тільки моделі 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2.

²- тільки моделі 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6.

каналу Нех ($C_p \text{ Нех} \leq 32$), або позитивний результат по каналах Fam і Нех, за умови $C_p \text{ Нех} \leq 32$ і $\Delta C_p = C_p (\text{Fam}) - C_p (\text{Нех})$ більше 10,0.

3.2 Чутливість аналізу

Кількість аналізованої ДНК має бути не менше 1,0 нг на ампліфікаційну пробірку.

При використанні меншої кількості ДНК ($C_p > 32,0$ на каналі детекції ВК (Нех)) виробник не гарантує коректну роботу набору.

Примітка - Кількість не менше 1,0 нг на ампліфікаційну пробірку відповідає $C_p \leq 32,0$ на каналі детекції ВК (Нех).

У зразках з недостатньою кількістю (менше 1,0 нг на ампліфікаційну пробірку) ДНК після завершення реакції ампліфікації визначається недостовірний результат.

3.3 Діагностичні характеристики

Кількість зразків	N = 150
Аналітична чутливість (95% ДІ)	100% (94,1-100%)
Аналітична специфічність (95% ДІ)	100% (95,9-100%)
Діагностична чутливість (95% ДІ)	100% (92,9-100%)
Діагностична специфічність (95% ДІ)	89% (81,2-94,4%)

4 ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

Робота повинна проводитися в лабораторії, яка виконує молекулярно-біологічні ПЛР дослідження клінічного матеріалу з дотриманням методичних вказівок МУ 1.3.2569-09 «Організація роботи лабораторій, що використовують методи ампліфікації нуклеїнових кислот при роботі з матеріалом, що містить мікроорганізми I-IV груп патогенності» і з дотриманням санітарно-епідеміологічних правил СП 1.3.2322-08 «Безпека роботи з мікроорганізмами III-IV груп патогенності (небезпеки) і збудниками паразитарних хвороб». Досліджувані зразки розглядаються як потенційно-небезпечні.

До роботи з набором реагентів допускається тільки персонал, навчений методам молекулярної діагностики та правилам роботи в клініко-діагностичній лабораторії.

Підготовку та проведення дослідження з використанням набору реагентів слід проводити в ПЛР-боксах.

Дозатори, що використовуються при роботі з набором, повинні бути відповідним чином повірені (в акредитованих лабораторіях) і промарковані.

Поверхні робочих столів, а також приміщень, в яких проводиться ПЛР, слід обов'язково, до і після проведення робіт, опромінювати бактерицидними лампами протягом однієї години.

Використані одноразові приналежності (пробірки, наконечники) повинні скидатися в ємність для скидання використаних наконечників, пробірок та інших витратних матеріалів.

При використанні набору в клініко-діагностичній лабораторії утворюються відходи класів А і Б, які класифікуються і утилізуються відповідно до вимог СанПіН 2.1.7.2790-10 «Санітарно-епідеміологічні вимоги щодо поводження з медичними відходами».

Не застосовувати набір реагентів:

- при порушенні умов транспортування і зберігання;
- при невідповідності зовнішнього вигляду реагентів, зазначеного в паспорті до набору;
- при порушенні внутрішньої упаковки компонентів набору;
- по закінченню терміну придатності набору.

Примітка- Набір реагентів **не містить** матеріалів біологічного походження, речовин, що мають канцерогенну, мутагенну дію, а також впливають на репродуктивну функцію людини. При використанні за призначенням і дотриманні запобіжних заходів є безпечним.

5 ОБЛАДНАННЯ І МАТЕРІАЛИ

При роботі з набором реагентів потрібні наступні обладнання і матеріали:

- детектуючий ампліфікатор: ДТлайт, ДТпрайм і ДТ-96;
- мікроцентрифуга-вортекс;
- холодильник побутовий;
- пробірки ампліфікаційні або стрипи з кришками об'ємом 0,2 ml (мл);
- пробірки одноразові пластикові об'ємом 1,5 ml (мл);
- штатив «робоче місце» для пробірок об'ємом 0,2 ml (мл) або стрипованих пробірок об'ємом 0,2 ml (мл);
- дозатори механічні або електронні змінного об'єму одноканальні дозволяють відбирати об'єми рідини від 2 до 20 μ l (мкл), від 20 до 200 μ l (мкл);
- одноразові наконечники з фільтром для напівавтоматичних дозаторів, вільні від ДНКаз і РНКаз, об'ємом 20 μ l (мкл), 200 μ l (мкл);
- одноразові рукавички медичні, без тальку, текстуровані;
- емність для скидання використаних наконечників, пробірок та інших витратних матеріалів;
- фізіологічний розчин (0,9% NaCl) стерильний;
- комплект для виділення ДНК з біологічного матеріалу (рекомендується ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА або ПРОБА-РАПІД-ГЕНЕТИКА виробництва ТОВ «НВО ДНК-Технологія»);
- програмне забезпечення для ампліфікаторів детектуючих ДТлайт, ДТпрайм і ДТ-96;
- версія ПО не нижче 7.5.5.23³;
- ini файл «HLA_B27.ini» з параметрами аналізу.

³- виробник рекомендує своєчасно оновлювати програмне забезпечення для детектуючих ампліфікаторів. Актуальну версію програмного забезпечення можна скачати на сайті компанії «ДНК-Технологія»: <https://www.dna-technology.ru/poequip/po-dlya-oborudovaniya>

6 АНАЛІЗОВАНІ ЗРАЗКИ

6.1 Матеріал для дослідження

Для дослідження використовують цільну периферичну кров людини.

Взяття, попередню обробку і зберігання матеріалу проводять відповідно до інструкції до комплекту реагентів для виділення ДНК з біологічного матеріалу.

6.2 Взяття периферичної крові

Взяття периферичної крові проводиться в вакуумні пластикові пробірки типу Vacuette об'ємом 2,0 або 4,0 ml (мл) з доданою, в якості антикоагулянту динатрієвою сіллю етилендіамінтетраацетата (ЕДТА) в кінцевій концентрації 2,0 mg/ml (мг/мл). В якості антикоагулянту допускається також використання цитрату натрію. Для перемішування крові з антикоагулянтом після взяття матеріалу необхідно перевернути пробірку 2-3 рази.

УВАГА! Не допускається використання гепарину як антикоагулянту.

6.3 Транспортування і зберігання досліджуваного матеріалу

Допускається зберігання зразків при температурі від 2°C до 8°C не більше 24 годин. У разі неможливості доставки матеріалу в лабораторію протягом доби допускається одноразове заморожування матеріалу. Допускається зберігання замороженого матеріалу при температурі від мінус 18°C до мінус 22°C не більше одного місяця.

7 ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

7.1 Виділення ДНК з біологічного матеріалу

Виділення ДНК проводять відповідно до інструкції до використовуваного комплекту реагентів. Рекомендовані комплекти для виділення ДНК з біологічного матеріалу: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА або ПРОБА-РАПІД-ГЕНЕТИКА.

Про можливості використання інших комплектів реагентів для виділення ДНК з біологічного матеріалу спільно з набором реагентів HLA-B27 можна дізнатися у представника компанії.

Незалежно від використовуваного комплекту реагентів для виділення ДНК одночасно з виділенням ДНК з периферичної крові необхідно провести через всі етапи пробопідготовки негативний контрольний зразок (в його якості можна використовувати стерильний фізіологічний розчин в об'ємі, зазначеному в інструкції до комплекту реагентів для виділення ДНК).

7.2 Підготовка і проведення ПЛР

7.2.1 Підготовка і проведення ПЛР (фасування S)

7.2.1.1 Промаркуйте по одній пробірці з сумішшю для ампліфікації, запаяній парафіном, для кожного досліджуваного зразка, негативного контрольного зразка і позитивного контрольного зразка.

- 7.2.1.2 Струсіть пробірку з розчином Таq-полімерази протягом 3-5 s (с) і центрифугуйте протягом 1-3 s (с) на мікроцентрифузі-вортекс.
- 7.2.1.3 Внесіть в кожну пробірку, не пошкоджуючи шар парафіну, по 10 μ l (мкл) розчину Таq-полімерази.
- 7.2.1.4 Далі виконайте пункти 7.2.3 - 7.2.9.
- 7.2.2 Підготовка і проведення ПЛР (фасування U)
- 7.2.2.1 Промаркуйте необхідну кількість пробірок для ампліфікації об'ємом 0,2 ml (мл) (по одній для кожного досліджуваного зразка, одну для позитивного контрольного зразка, одну для негативного контрольного зразка).
- 7.2.2.2 Струсіть пробірку з сумішшю для ампліфікації протягом 3-5 s (с) і центрифугуйте протягом 1-3 s (с) на мікроцентрифузі-вортекс.
- 7.2.2.3 Внесіть в промарковані пробірки по 20 μ l (мкл) суміші для ампліфікації.
- 7.2.2.4 Струсіть пробірки з ПЛР-буфером і полімеразою ТехноТаq МАХ протягом 3-5 s (с) і центрифугують протягом 1-3 s (с) на мікроцентрифузі-вортекс.

УВАГА! Полімеразу ТехноТаq МАХ необхідно виймати з морозильної камери безпосередньо перед використанням.

- 7.2.2.5 Приготуйте суміш ПЛР-буфера з полімеразою ТехноТаq МАХ.

УВАГА! Суміш ПЛР-буфера і полімерази ТехноТаq МАХ необхідно готувати безпосередньо перед використанням.

Змішайте в окремій пробірці:

- 10x(N + 1) μ l (мкл) ПЛР-буфера;
- 0,5x(N + 1) μ l (мкл) полімерази ТехноТаq МАХ,
де N - кількість промаркованих пробірок з урахуванням К+ і К-.

Наприклад, необхідно проаналізувати п'ять зразків.

Промаркуйте сім пробірок (п'ять для досліджуваних зразків, одна для К+, одна для К-). Приготуйте суміш ПЛР-буфера і полімерази ТехноТаq МАХ для восьми (7+1) пробірок, тобто 80 мкл ПЛР-буфера плюс 4,0 μ l (мкл) полімерази ТехноТаq МАХ.

- 7.2.2.6 Струсіть пробірку з отриманою сумішшю протягом 3-5 s (с) і центрифугуйте протягом 1-3 s (с) на мікроцентрифузі-вортекс.
- 7.2.2.7 Додайте в кожну пробірку з сумішшю для ампліфікації по 10 μ l (мкл) суміші ПЛР-буфера з полімеразою ТехноТаq МАХ.

УВАГА! Після додавання суміші ПЛР-буфера і полімерази ТехноТаq МАХ в пробірки із сумішшю для ампліфікації необхідно протягом двох годин виконати пункти 7.2.3 - 7.2.9.

- 7.2.3 Внесіть в кожну пробірку по одній краплі (близько 20 μ l (мкл)) мінерального масла. Закрийте кришки пробірок.

- 7.2.4 Для запобігання контамінації слід перед внесенням ДНК відкривати кришку тільки тієї пробірки, в яку буде вноситися даний зразок, і закривати її перед внесенням наступного. Препарати ДНК слід вносити наконечниками з фільтром.
Внесіть, не пошкоджуючи шар парафіну, по 5,0 μ l (мкл) виділеного зі зразків препарату ДНК до відповідних пробірок для досліджуваних зразків.
- 7.2.5 Внесіть, не пошкоджуючи шар парафіну, 5,0 μ l (мкл) позитивного контрольного зразка в пробірку позначену «К+».
- 7.2.6 Внесіть, не пошкоджуючи шар парафіну, 5,0 μ l (мкл) негативного контрольного зразка, що пройшов етап виділення ДНК, в пробірку, позначену «К-».
- 7.2.7 Центрифугуйте пробірки протягом 1-3 s (с) на мікроцентрифузі-вортекс.
- 7.2.8 Встановіть всі пробірки в блок детектуючого ампліфікатора. Рекомендується розташовувати пробірки по центру термоблока.
- 7.2.9 Відкрийте програму RealTime_PCR, виберіть оператора, виберіть режим «Робота з приладом». При першому проведенні ПЛР завантажте ini файл «HLA_B27.ini» (7.3). При наступних постановках додайте в протокол тест «HLA_B27» (7.4), вкажіть кількість і ідентифікатори зразків, в тому числі негативного і позитивного контрольних зразків, відзначте розташування пробірок на матриці термоблока відповідно до їх установки (7.2.8) і проведіть ПЛР. При виборі тесту «HLA_B27» у вікні «Запуск програми ампліфікації» повинна відобразитися програма, наведена в таблиці 2.

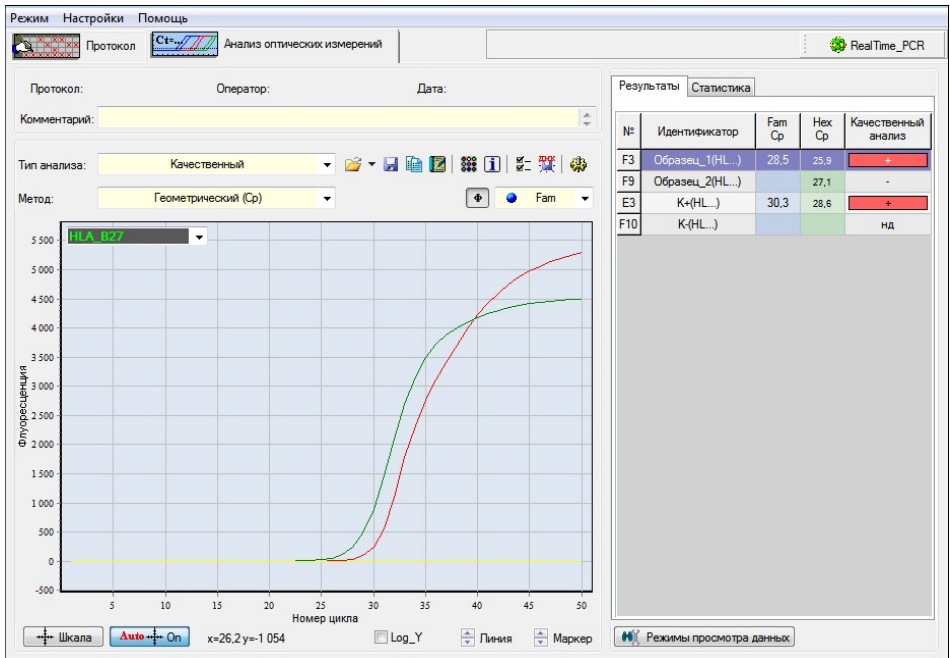
Таблиця 2 - Програма ампліфікації для детектуючих ампліфікаторів ДТлайт, ДТпрайм і ДТ-96

№ блоку	Температура, °C	хв	s (с)	Число циклів	Режим оптичних вимірювань	Тип блоку
1	80,0	0	30	1		Цикл
	94,0	1	30			
2	94,0	0	30	5		Цикл
	64,0	0	15		√	
3	94,0	0	10	45		Цикл
	64,0	0	15		√	
4	94,0	0	5	1		Цикл
5	10,0	Зберігання		Зберігання

УВАГА! При використанні інших ампліфікаторів необхідно уточнити програму ампліфікації у представника компанії.

8 РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ АМПЛІФІКАЦІЇ

- 8.1 Реєстрація результатів ПЛР здійснюється автоматично за допомогою програмного забезпечення, що надається з детектуючим ампліфікатором.
- 8.2 Детекція і облік результатів здійснюються детектуючим ампліфікатором автоматично.
- 8.3 Аналіз проводиться програмним забезпеченням.
На графіку буде відображена залежність флуоресценції від номера циклу для кожної пробірки в термоблоці. У таблиці праворуч буде показаний ідентифікатор зразка, індикаторний цикл (Cp).
Приклад видачі результатів приладом:



9 ОБЛІК І ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ РЕАКЦІЇ

- 9.1** Облік результатів реакції здійснюється автоматично за допомогою програмного забезпечення, що поставляється з детектуючим ампліфікатором.
- 9.2** Інтерпретація результатів для кожного зразка проводиться з урахуванням значень C_p по каналу специфіки (канал Fam) і внутрішнього контролю (канал Hex) відповідно до таблиці 3.

Таблиця 3 - Обчислення та інтерпретації результатів дослідження

Результат по каналу Fam C_p (Fam)	Результат по каналу Hex C_p (Hex)	$\Delta C_p = C_p$ (Fam) - C_p (Hex)	Інтерпретація результату
C_p вказано	$C_p \leq 32^*$	менше 8,0	алель HLA-B27 виявлено
C_p вказано	$C_p \leq 32$	більше 10,0	алель HLA-B27 не виявлено
C_p не вказано	$C_p \leq 32$	не враховується	
C_p вказано	$C_p \leq 32$	8,0 - 10,0	результат сумнівний
C_p вказано / не вказано	C_p не вказано	не враховується	результат недостовірний
	$C_p > 32,0$	не враховується	
* - відповідає кількості аналізованої ДНК більше 1,0 нг на ампліфікаційну пробірку			

- 9.3** У разі отримання сумнівного результату необхідно повторити проведення полімеразної ланцюгової реакції для даного зразка. При повторному отриманні такого ж результату слід повторити пробопідготовку і проведення ПЛР для даного зразка. Якщо ДНК отримана при використанні комплекту реагентів для виділення ПРОБА-РАПІД-ГЕНЕТИКА і значення $\Delta C_p = C_p$ (Fam) - C_p (Hex) укладається в межі від 8,0 до 10,0 слід розвести отриманий препарат ДНК в 10 разів стерильною дистильованою водою. При цьому необхідно врахувати, що показник « C_p Hex» зміниться. В даному випадку для зразка достовірним необхідно вважати тільки той результат, для якого C_p Hex < 35,0.
- 9.4** У разі отримання недостовірного результату потрібно або повторне виділення ДНК і постановка ПЛР, або повторне взяття клінічного матеріалу (виконується послідовно). Недостовірний результат може бути пов'язаний з присутністю інгібіторів в препараті ДНК, отриманому з клінічного матеріалу; невірним виконанням протоколу аналізу; недотриманням температурного режиму ампліфікації і ін.
- 9.5** У позитивному контрольному зразку повинен визначитися алель HLA-B27. При отриманні негативного або недостовірного результату для позитивного контрольного зразка результати всієї постановочної серії вважають недостовірними. В цьому випадку необхідна повторна постановка ампліфікації всієї партії зразків.

9.6 Для негативного контрольного зразка повинен бути зафіксований недостовірний результат. При отриманні інших значень результати всієї постановочної серії вважають недостовірними. В цьому випадку необхідно проведення спеціальних заходів для усунення можливої контамінації.

10 ТРАНСПОРТУВАННЯ, ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЯ

10.1 Транспортування

10.1.1 Транспортування набору здійснюють усіма видами критого транспорту при температурах, що відповідають умовам зберігання компонентів, які входять до складу набору.

10.1.2 Набори реагентів, транспортовані з порушенням температурного режиму, застосуванню не підлягають.

10.2 Зберігання

10.2.1 Компоненти набору (за винятком полімерази ТехноТаq МАХ) слід зберігати при температурі від 2°C до 8°C протягом усього терміну придатності набору. Полімеразу ТехноТаq МАХ - при температурі від мінус 18°C до мінус 22°C протягом усього терміну придатності набору. Суміші для ампліфікації слід зберігати в захищеному від світла місці протягом всього терміну придатності набору.

10.2.2 Набори реагентів, які зберігалися з порушенням регламентованого режиму, застосуванню не підлягають.

10.3 Вказівки по експлуатації

10.3.1 Набір повинен застосовуватися відповідно до чинної версії затвердженої інструкції по застосуванню. Для отримання надійних результатів необхідно суворе дотримання інструкції по застосуванню набору.

10.3.2 Після відкриття упаковки компоненти набору слід зберігати за таких умов:

- компоненти набору (за винятком полімерази ТехноТаq МАХ) слід зберігати при температурі від 2°C до 8°C протягом усього терміну придатності набору;
- суміші для ампліфікації слід зберігати при температурі від 2°C до 8°C в захищеному від світла місці протягом всього терміну придатності набору;
- полімеразу ТехноТаq МАХ - при температурі від мінус 18°C до мінус 22°C протягом усього терміну придатності набору.

10.3.3 Набори з вичерпаним терміном придатності застосуванню не підлягають.

11 РЕКОМЕНДАЦІЇ З УТИЛІЗАЦІЇ

- 11.1** Набори з вичерпаним терміном придатності та невикористані реактиви утилізують відповідно до вимог СанПіН 2.1.7.2790-10 «Санітарно-епідеміологічні вимоги щодо поводження з медичними відходами».
- 11.2** Непридатні для використання набори реагентів, упаковка набору реагентів (пробірки, флакони, поліетиленові пакети з замком і коробки з картону) відносяться до відходів класу А і утилізуються з побутовими відходами.










12 ГАРАНТІЇ ВИРОБНИКА

- 12.1** Підприємство-виробник гарантує відповідність набору вимогам технічних умов при дотриманні умов транспортування, зберігання та застосування, встановлених ДСТУ.
- 12.2** Термін придатності набору - 12 місяців при дотриманні всіх умов транспортування, зберігання та експлуатації.

13 РЕМОНТ І ТЕХНІЧНЕ ОБСЛУГОВУВАННЯ

Набір реагентів призначений для одноразового використання і не підлягає технічному обслуговуванню та поточному ремонту.

14 СИМВОЛИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ ПРИ МАРКУВАННІ НАБОРУ

	Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i>
	Температурне обмеження
	Містить достатньо для <n> - кількості тестів
	Використати до
	Код партії
	Дата виготовлення
	Зверніться до інструкції із застосування
	Каталожний номер
	Виробник
	Оберігати від сонячного світла

15 ПЕРЕЛІК ЗАСТОСОВУВАНИХ НАЦІОНАЛЬНИХ СТАНДАРТІВ

ГОСТ 2.105-95 Загальні вимоги до текстових документів.

ГОСТ ISO 14971-2011 Вироби медичні. Застосування менеджменту ризику до медичних виробів.

ГОСТ Р 15.309-98 Система розробки і постановки продукції на виробництво. Випробування і приймання продукції, що випускається. Основні положення.

ГОСТ Р 51088-2013 та вироби медичного призначення для діагностики *in vitro*. Реагенти, набори реагентів, тест-системи, контрольні матеріали, поживні середовища. Вимоги до виробів і підтримуючої документації.

ГОСТ Р 51352-2013 та вироби медичного призначення для діагностики *in vitro*. Методи випробувань.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Вимоги до якості клінічних лабораторних досліджень.

Ч.3. Правила оцінки клінічної інформативності лабораторних тестів.

ГОСТ ISO 18113-1-2015 та вироби медичного призначення для діагностики in vitro. Інформація, яку надає виробником (маркування). Частина 1. Терміни, визначення та загальні вимоги.

ГОСТ ISO 18113-2-2015 та вироби медичного призначення для діагностики in vitro. Інформація, яку надає виробником (маркування). Частина 2. Реагенти для діагностики in vitro для професійного застосування.

ГОСТ ISO 23640-2015 Вироби медичні для діагностики in vitro. Оцінка стабільності реагентів для діагностики in vitro.

ГОСТ ISO 15223-1-2014 Вироби медичні. Символи, що застосовуються при маркуванні на медичні вироби, етикетках і в супровідній документації. Ч.1. Основні вимоги.

ГОСТ Р 52905-2007 (ISO 15190: 2003) Лабораторії медичні. Вимоги безпеки.

Примітка - Зазначені вище стандарти були діючими на момент затвердження інструкції по застосуванню. Надалі, при користуванні документом, доцільно перевірити дію посилальних нормативних документів на поточний момент. Якщо контрольний документ замінений або змінений, то при застосуванні цього документа слід користуватися заміненим (зміненим) документом.

16 АДРЕСА ДЛЯ ЗВЕРНЕНЬ

Рекламації з питань якості набору реагентів HLA-B27 слід надсилати до уповноваженого представника виробника в Україні за адресою:

ТОВ «ДНК-ТЕХНОЛОГІЯ УКРАЇНА», Україна, 04176, м. Київ, вулиця Електриків, будинок 26, корпус 43, приміщення 5, тел.+ 38 067 409 45 67, info@dna-technology.ua

Служба клієнтської підтримки виробника:

8-800-200-75-15 (для Росії, дзвінок безкоштовний),

+7 (495) 640-16-93 (для країн СНД і зарубіжжя, дзвінок платний).

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Служба клієнтської підтримки уповноваженого представника виробника в Україні:

+38 (067) 352-90-02 (дзвінок за тарифом оператора)

E-mail: info@dna-technology.ua

Виробник: ТОВ «НВО ДНК-Технологія», Росія.

Адреса виробника: 142281, Росія, Московська область, м. Протвіно, вул. залізнична, б. 20.

Місце виробництва: ТОВ «ДНК-Технологія ТС», 117246, Росія, м. Москва, проїзд Науковий, б. 20, будова. 4.

Номер: UA196-12
2021-09-17

ДНК-Технологія

117587, Росія, м. Москва, вн. тер. м. муніципальний округ Чертаново
Північне, ш. Варшавське, б. 125 Ж, к. 5, поверх 1, прим. 12

Тел./факс +7 (495) 640-17-71

Служба клієнтської підтримки виробника:

8-800-200-75-15 (для Росії, дзвінок безкоштовний)

+7 (495) 640-16-93 (для країн СНД і зарубіжжя, дзвінок платний)

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Служба клієнтської підтримки уповноваженого представника
виробника в Україні:

+38 (067) 352-90-02 (дзвінок за тарифом оператора)

E-mail: info@dna-technology.ua



Виробник: ТОВ «НВО ДНК-Технологія»

142281, Росія, Московська область, м. Протвіно,
вул. Залізнична, б. 20

Місце виробництва: ТОВ «ДНК-Технологія ТС»

117246, Росія, м. Москва, проїзд Науковий, б. 20, будова. 4

Уповноважений представник в Україні:

ТОВ «ДНК-ТЕХНОЛОГІЯ УКРАЇНА»

Україна, 04176, місто Київ, вулиця Електриків,

будинок 26, корпус 43, приміщення 5,

Тел.: + 38 067 409 45 67,

Електронна пошта: info@dna-technology.ua



UA.TR.099

Дата останнього перегляду інструкції із застосування 2021-09-17