

Федеральное бюджетное учреждение науки
**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ им. ПАСТЕРА**
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
(ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера)
197101, Россия, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14.
Телефон (812) 233-20-92, факс (812) 644-63-10
E-mail: pasteur@pasteurorg.ru; официальный веб-сайт: www.pasteurorg.ru
ОКПО 01967164, ОГРН 001037828006314; ИНН/КПП 7813047047/781301001

**ИНСТРУКЦИЯ по применению
Набора регентов для количественного определения
эксцизионных колец TREC и KREC
методом полимеразной цепной реакции
с детекцией в режиме реального времени
(TREC/KREC-Amp PS)**

ТУ 21.20.23-033-01967164-2022
РУ МИ-RUBY-000031 от 11 января 2023 г. № 15

Оглавление

| | |
|---|----|
| 1. Общие сведения | 3 |
| 2. Риски применения..... | 4 |
| 3. Характеристика МИ..... | 5 |
| 4. Меры предосторожности | 8 |
| 5. Требуемое дополнительное оборудование и материалы | 10 |
| 6. Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала..... | 10 |
| 7. Проведение исследования | 12 |
| 8. Условия транспортирования и хранения МИ | 17 |
| 9. Указания по утилизации..... | 18 |
| 10. Объяснение используемых символов | 18 |

Настоящая инструкция содержит информацию, необходимую для правильного и безопасного применения медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для количественного определения эксцизионных колец TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (TREC/KREC-Amp PS)» (далее по тексту - Набор реагентов или МИ), разработанного и произведенного Федеральным бюджетным учреждением науки Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера).

1. Общие сведения

1.1 Назначение

Набор реагентов предназначен для количественного определения в образцах периферической крови (цельная кровь, сухая капля крови) ДНК TREC (эксцизионное кольцо T-клеточного рецептора) и KREC (эксцизионное кольцо рекомбинационного каппа-делетирующего элемента В-клеточного рецептора) в качестве вспомогательного средства для оценки Т- и В-клеточного иммунодефицита у человека, включая скрининг иммунного статуса у новорожденных.

1.2 Потенциальные потребители

Потенциальными потребителями являются специалисты медицинских учреждений, связанных с диагностикой заболеваний и оказанием медицинской помощи новорожденным, а также пациентам с иммунодефицитами различной природы, включая инфекционную, в том числе врачи-иммунологи, инфекционисты, неонатологи, педиатры, а также специалисты медицинских учреждений, имеющие специальность врача клинической лабораторной диагностики или биолога. К работе с Набором реагентов допускаются только специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Требования по профилактике инфекционных болезней»).

1.3 Специфическая патология и диагностические маркеры

Полное или частичное отсутствие (снижение уровней) Т- и/или В-клеток характерно при первичных иммунодефицитах (ПИД), трисомиях 21-й и 18-й хромосом, различных генетических мутациях у детей, а также при недоношенности у младенцев, в том числе при плановом кесаревом сечении. При вторичных иммунодефицитных состояниях различного генеза у взрослых людей также наблюдается недостаточность наивных Т- и В-клеток.

В качестве генетических маркеров для скрининга Т- и В-клеточного иммунодефицита используют эксцизионные кольца (англ. T-cell receptor excision circles – TREC) Т-клеточных рецепторов и каппа-делетирующие рекомбинационные эксцизионные кольца (англ. kappa-deleting recombination excision circles – KREC) В-клеточных рецепторов, представляющие собой небольшие кольцевые фрагменты эписомальной ДНК, которые образуются при перестройке Т-клеточного и В-клеточного рецепторов в наивных Т- и В-лимфоцитах, происходящей в тимусе и

костном мозге соответственно. Молекулы TREC и KREC не деградируют и не реплицируются с последующим делением лимфоцитов в фазу антигензависимой дифференцировки.

Анализ TREC и KREC дает ценную диагностическую и прогностическую информацию в отношении широкого спектра заболеваний, связанных с нарушением Т-и/или В-клеточного звена иммунитета, что позволяет выявлять пациентов для более углубленного обследования и своевременного назначения адекватной терапии.

1.4 Показания к применению

Применять в соответствии с назначением.

1.5 Популяционные, демографические аспекты применения

При использовании необходимо учитывать границы нормы TREC и KREC у представителей различных рас, этнических популяций и различных возрастных групп.

2. Риски применения

Все компоненты МИ в используемых концентрациях являются нетоксичными, поэтому при использовании по целевому назначению МИ безопасно и не обладает токсичностью. Однако все образцы клинического материала, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны применяться требования СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Риски возникновения опасных последствий применения МИ «TREC/KREC-Amp PS» при его использовании определены согласно требованиям Решения Евразийской экономической комиссии № 27 от 12.02.2016 г., ГОСТ ISO 14971 и ГОСТ Р 51088.

2.1 Потенциальный риск применения

По степени потенциального риска применения МИ «TREC/KREC-Amp PS» относится к классу 2б (согласно Решению Евразийской экономической комиссии № 173 от 22.12.2015 г.). Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

2.2 Прямой риск применения

При использовании МИ требуется соблюдение мер биологической безопасности и асептической техники взятия биологических образцов. Следует исходить из предположения, что все собранные для исследования с применением МИ «TREC/KREC-Amp PS» образцы представляют собой потенциально инфицированный материал, обращаться с которым следует, соблюдая технику безопасности согласно требованиям СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и следовать рекомендациям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности».

2.3 Косвенный риск применения

Косвенный риск применения МИ «TREC/KREC-Amp PS» связан с вероятностью получения как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов, что может привести к ошибочному медицинскому решению и отрицательно повлиять на тактику терапевтических мероприятий.

Причинами ложноположительных результатов могут быть:

– порча отдельных компонентов МИ в результате несоблюдения условий его транспортировки и хранения до использования;

– превышение гарантийных сроков хранения, указанных на этикетках;

– несоблюдение требований инструкции по применению в ходе обработки образцов;

– прием пациентом (матерью новорожденного) иммуносупрессивных препаратов, препаратов моноклональных антител, а также препаратов крови, переливание крови (за 2-3 месяца до проведения диагностики).

Причинами ложноотрицательных результатов могут быть:

– контаминация реагентов в результате нарушения целостности упаковки;

– длительная контаминация лабораторных помещений, оборудования, расходных материалов в результате проведения работ персоналом, не обладающим достаточной квалификацией;

– несоблюдение указаний об опасностях повторного применения расходных материалов, предназначенных для однократного применения.

3. Характеристика МИ

Код вида МИ в соответствии с номенклатурой медицинских изделий, применяемой в рамках Евразийского экономического союза – 213350.

3.1 Принцип количественного аналитического метода исследования

Принцип тестирования основывается на амплификации целевых специфических фрагментов ДНК TREC, KREC и фрагментов генов «домашнего хозяйства» HPRT (гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза) и RPP30 (белковая субъединица р30 рибонуклеазы Р), выступающих в качестве внутреннего нормировочного контроля, непосредственно по мере накопления продуктов амплификации, в ходе которой происходит гибридизация олигонуклеотидных праймеров и зондов с комплементарными участками ДНК-мишеней. Образование специфического продукта амплификации в присутствии фермента Taq-полимеразы сопровождается отщеплением флуоресцентной метки от зондов, благодаря наличию у Taq-полимеразы 5'-экзонуклеазной активности. Олигонуклеотидные зонды, используемые для детекции ДНК целевых молекул и детекции фрагментов

ДНК нормировочных генов, имеют флуоресцентные метки с разными спектрами поглощения и испускания, что позволяет проводить одновременную регистрацию флуоресценции по четырем каналам амплификатора с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени: ДНК TREC – по каналу детекции FAM/Green;

ДНК KREC – по каналу детекции JOE/HEX; ДНК гена RPP30 – по каналу детекции ROX; ДНК гена HPRT – по каналу детекции Cy5.

Начало флуоресценции и ее интенсивность количественно зависят от концентрации детектируемого фрагмента ДНК в образце.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, применяемого для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», и использования калибровочных кривых, построенных при амплификации ДНК калибраторов, представляющих собой серию последовательных разведений плазмидной ДНК, содержащей нуклеотидные последовательности, соответствующие фрагментам целевых молекул TREC, KREC и двух нормировочных генов «домашнего хозяйства» HPRT и RPP30, с известными концентрациями. При этом получают значения концентраций TREC, KREC, HPRT и RPP30 в образце (копий/мл).

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции калибраторов в логарифмической шкале), что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла Ct в соответствующей графе в таблице результатов. Результат амплификации по каждому каналу считается положительным, если кривая однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, отрицательным в случае отсутствия пересечения кривой с пороговой линией (нет значения Ct), и сомнительным во всех других случаях.

Наличие в составе Набора реагентов Калибраторов K1 – K5 с известной концентрацией и отрицательного контрольного образца K- позволяет контролировать все этапы анализа для каждого исследуемого образца и оценивать влияние потенциальных ингибиторов на результаты амплификации.

На основании значений порогового цикла «Ct» и заданных значений Калибраторов происходит автоматическое построение калибровочных прямых и расчет значений концентрации ДНК (копий/мл) искомого анализатора. Полученные значения используют для расчета нормализованной концентрации ДНК TREC и KREC по отношению к ДНК генов «домашнего хозяйства» в единицах копий/10⁵ клеток.

По результатам определения TREC и KREC делают выводы об уровне содержания наивных Т- и В-лимфоцитов в сравнении с показателями нормы.

ПЦР необходимо проводить на амплификаторах с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени по каналам HEX/JOE/Yellow, FAM/Green, ROX/Orange и Cy5/Red планшетного типа (например, CFX96) или роторного типа (например, Rotor-Gene 3000/6000).

3.2 Состав МИ

Набор реагентов «TREC/KREC-Amp PS» выпускается в одном варианте комплектации, рассчитанном на 100 определений (табл. 1).

3.3 Описание основных компонентов МИ

Реагент Amp 1 – прозрачная или слабо опалесцирующая слабоязкая бесцветная жидкость, представляющая собой буферный раствор, содержащий дезоксиинуклеозидтрифосфаты и ДНК-полимеразу.

Реагент Amp 2 – прозрачная жидкость со слабым розовым оттенком, представляющая собой буферный раствор, содержащий олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно меченые олигонуклеотидные зонды, комплементарные к специфическим последовательностям нуклеотидов ДНК TREC, KREC, RPP30, HPRT для проведения ПЦР.

Калибраторы K1 – K5 – прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой препараты плазмиды, содержащей вставки ДНК, соответствующие фрагментам TREC, KREC, RPP30, HPRT, амплифицируемым с участием Реагентов Amp 1 и Amp 2, в концентрациях, указанных в паспорте качества.

Контроль K- – прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой воду деионизированную.

Таблица 1 - Состав медицинского изделия

| Наименование компонента МИ | Объем, мл | Количество, шт. |
|----------------------------|-----------|-----------------|
| Реагент Amp 1 | 1,5 | 1 |
| Реагент Amp 2 | 0,3 | 1 |
| Калибратор K1 | 0,1 | 1 |
| Калибратор K2 | 0,1 | 1 |
| Калибратор K3 | 0,1 | 1 |
| Калибратор K4 | 0,1 | 1 |
| Калибратор K5 | 0,1 | 1 |
| Контроль K- | 0,1 | 1 |

Калибраторы используются для автоматического построения калибровочных графиков и расчета концентраций (копий/мл) целевых молекул ДНК TREC (по каналу FAM/Green), KREC (по каналу HEX/JOE/Yellow) и нормировочных генов HPRT (по каналу Cy5/Red) и RPP30 (по каналу ROX/Orange) в анализируемых образцах.

Каждая внешняя (потребительская) упаковка изделия должна быть сопровождена инструкцией по применению. Инструкция по применению может быть изготовлена в бумажном виде или на электронном носителе, или представлена на официальном веб-сайте производителя (www.pasteurorg.ru). По требованию заказчика производитель предоставляет паспорт качества на серию медицинского изделия. Паспорт качества содержит переменную информацию.

3.4 Показатели аналитической эффективности

Точность (правильность) измерений концентрации ДНК KREC/KREC в образце находится в пределах от 90 % до 110 % (тест на открытие).

Предел обнаружения ДНК KREC/KREC в образце составляет 10^3 копий/мл.

Аналитический диапазон измерений 10^3 – 10^8 копий/мл.

Значение линейности при определении концентрации ДНК KREC/KREC в образцах в интервале 10^3 – 10^8 копий/мл находится в пределах от 90 % до 110 %. Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость, а также воспроизводимость при работе на различных приборах значений концентраций ДНК KREC/KREC в образцах по коэффициенту вариации (CV) не превышает 8,0 %.

Аналитическая специфичность определена в ходе анализа *in silico* с помощью алгоритма BLASTn в международной базе данных GenBank специфических нуклеотидных последовательностей фрагментов целевых генов TREC и KREC, а также RPP30 и HPRT, используемых в качестве генетических мишеней для ПЦР, в результате которого установлена нуклеотидная идентичность только с последовательностями соответствующих генов TREC, KREC, RPP30 и HPRT в геноме человека.

Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность по результатам клинико-лабораторных испытаний составила 100 %.

Гепарин может оказывать интерферирующее действие на ПЦР и, тем самым, влиять на аналитическую эффективность Набора реагентов. Поэтому согласно МУ 1.3.2569-09 при заборе крови нельзя использовать гепарин в качестве антикоагулянта.

Интерферирующее действие также может оказать прием донорами крови иммуносупрессивных препаратов, препаратов моноклональных антител, а также препаратов крови. Не допускается использование проб с сухими пятнами крови, полученных от новорожденных, матери которых получали указанные препараты.

Метрологическая прослеживаемость измерений концентраций ДНК TREC/KREC в калибраторах K1, K2, K3, K4, K5 оценена согласно иерархии калибровки в соответствии с ГОСТ ISO 17511-2011 при использовании оригинальной методики, не являющейся международно признанной референтной методикой выполнения измерений калибратора, не являющегося международно признанным, и без метрологической прослеживаемости до единиц СИ.

4. Меры предосторожности

Работа должна проводиться в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические (ПЦР) или бактериологические исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, имеющих разрешительную документацию на работу с возбудителями III-IV групп патогенности, специально обученным персоналом.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- температура в помещении лаборатории должна быть от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%;
- лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в зоне экстракции (№1), продолжать в зонах амплификации (№2) и детекции (№3). Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса;
- уничтожать образцы в соответствии СанПиН 2.1.3684-21;
- использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов;
- поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин;
- набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. п. 3.2);
- применять набор строго по назначению;
- к работе с набором реагентов допускаются только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы с микроорганизмами III группы патогенности в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»);
- не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию;
- не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции;
- не использовать набор реагентов по истечении срока годности;
- использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами, тщательно вымыть руки по окончании работы;
- избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой, при контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью;
- при соблюдении условий транспортирования, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют;
- информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности МИ безопасно.

5. Требуемое дополнительное оборудование и материалы

ПЦР и детекция продуктов амплификации в режиме реального времени проводятся в зоне №2 лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот, и нуждается в применении следующего дополнительного оборудования и материалов:

- 1) программируемый термоциклер с функцией амплификации в режиме «реального времени» с обязательным наличием четырех каналов детекции флуоресценции (FAM/Green, HEX/JOE/Yelow, ROX/Orange и Cy5/Red) планшетного типа – Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad Laboratories Inc., США) или роторного типа – Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Германия), или аналогичные по функциональным характеристикам;
- 2) бокс биологической безопасности II и III класса или настольный бокс с бактерицидной лампой (ПЦР-бокс; УФ-бокс) – 2 шт. (для приготовления реакционной смеси и для раскапывания образцов ДНК/продуктов амплификации после первого этапа ПЦР);
- 3) холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С и от минус 18 до минус 25 °С;
- 4) дозаторы медицинские лабораторные переменного объема от 2 до 20 мкл; от 20 до 200 мкл; от 100 до 1000 мкл (например, ООО «Биохит», Россия);
- 5) наконечники к дозаторам медицинским лабораторным с аэрозольным барьером, сертифицированные на отсутствие ДНКаз;
- 6) емкость для сброса отработанных расходных материалов;
- 7) комплект спецодежды – халат, шапочка, обувь, предназначенные для работы в каждой зоне отдельно;
- 8) резиновые (латексные, нитриловые, виниловые) неопудренные перчатки одноразового применения;
- 9) пробирки, стрипы или планшеты (в зависимости от количества проб, анализируемых в ходе одного эксперимента), совместимые с моделью термоциклера, из оптически прозрачного пластика для ПЦР;
- 10) пробирки типа эппендорф объемом 1,5 мл;
- 11) штативы для микропробирок объемом 0,6-1,5 мл;
- 12) штативы (3 шт.) для наконечников объемом 1-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл;
- 13) штативы для оптически-прозрачного пластика;
- 14) миницентрифуга-вортекс со сменными роторами: ротор для ПЦР-планшетов, с крышкой-фиксатором; ротор для микропробирок объемом 0,6–1,5 мл; ротор для стрипов;
- 15) раствор для деконтаминации (в случае контаминации) (0,2%-ный раствор ДП-2Т, хлорацета или аналогичный).

6. Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала

Основным видом клинического материала для лабораторного исследования является цельная кровь или сухие пятна крови (сухая капля крови).

6.1 Сухие пятна крови (сухая капля крови) на картах Гатри

Для получения сухих пятен крови применяются носители на основе фильтровальной бумаги или целлюлозы, содержащие реагенты для лизирования клеток, денатурации белков и защиты нуклеиновых кислот от нуклеаз, окисления и разрушения ультрафиолетовым излучением.

Отбор материала осуществляется в соответствии с законодательством Российской Федерации (Приложение № 2 приказа Минздравсоцразвития России от 22.03.2006 №185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания»). Для получения сухого пятна крови участок карты пропитывают капиллярной кровью, взятой из пятки новорождённого или пальца пациента старшего возраста. Образовавшееся пятно должно быть диаметром не менее 2 см. Для увеличения достоверности исследования получают 2-3 пятна крови. Образец высушивают на воздухе в горизонтальном положении на чистой обезжиренной поверхности не менее 2 ч без применения дополнительной тепловой обработки и попадания прямых солнечных лучей. Недопустимо прикасаться к пятну во избежание контаминации и получения неверных результатов. После высыхания карты герметично упаковывают в индивидуальный чистый конверт, маркируют, упаковывают и плотно закрывают. Сопроводительную документацию, оформленную на каждую пробу, прикладывают отдельно от исследуемого материала в соответствии с ГОСТ Р 55992.2. Доставку сухих пятен крови на картах Гатри для проведения исследований в лабораторию, проводящую обследование, осуществляют в герметичной упаковке с соблюдением температурного режима (от 2 до 8 °С). Сухие пятна крови на картах Гатри хранят при температуре от 2 до 25 °С, избегая попадания влаги. После транспортировки и хранения не вскрывают герметичную упаковку до момента достижения комнатной температуры (от 18 до 25 °С). Срок хранения карты с нанесённым биоматериалом в герметичной упаковке составляет от нескольких месяцев до нескольких лет в соответствии с ГОСТ Р 55992.2.

6.2 Цельная кровь

Данная форма клинического материала категорически запрещена для взятия у новорожденных.

Отбор образцов крови осуществляется из локтевой вены одноразовой иглой в вакуумные одноразовые пробирки, содержащие антикоагулянт этилендиаминтетрауксусной кислоты дикалиевая или трикалиевая соль (ЭДТА). Пробирку с закрытой крышкой аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. Нельзя встряхивать пробирку, так как это может вызвать пенообразование и гемолиз. Не допускать образования сгустка крови, выделение ДНК станет невозможным. Гепарин и цитрат натрия в качестве антикоагулянта использовать нельзя. Манипуляции по забору, транспортировке, приготовлению образцов выполняют в соответствии с ГОСТ Р 53079.4. Пробирки с образцами крови маркируют, упаковывают и плотно закрывают.

Сопроводительную документацию, оформленную на каждую пробу, прикладывают отдельно от исследуемого материала в соответствии с ГОСТ Р 55992.2. Образцы цельной крови могут храниться в течение 6 ч при температуре от 2 до 8 °С и в течение 2 ч при температуре от 20 до 25 °С.

Образцы цельной крови могут транспортироваться в течение 6 ч при температуре от 2 до 8 °С и в течение 2 ч при температуре от 20 до 25 °С в соответствии с методическими указаниями (МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории»).

Открывать пробирки с образцами цельной крови до момента доставки их на исследование в клинико-диагностическую лабораторию недопустимо.

Все работы с материалом, подозрительным на заражение гемоконтактными патогенами, включая взятие крови, транспортирование и подготовку материала для исследований, проводятся в соответствии с действующими нормативными и методическими документами, регламентирующими деятельность с возбудителями инфекционных заболеваний, СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и согласно требованиям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

7. Проведение исследования

7.1 Меры предосторожности

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Все работы проводятся при 20–28 °С и относительной влажности воздуха 15–75%.

7.1.1 Меры предосторожности для оператора

Набор не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности.

Необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами, тщательно вымыть руки по окончании работы.

Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием.

Запрещается их перемещение между рабочими местами.

Необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов

Не допускается повторное использование наконечника.

Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами в последующей утилизацией.

7.1.2 Меры предотвращения контаминации

Этапы работы необходимо проводить в отдельных помещениях в условиях изолированных зон, снабженных необходимыми расходными материалами и оборудованием. В работе с Набором реагентов задействованы следующие зоны:

– зона № 1 для работы с геномной ДНК/РНК – подготовка исследуемых образцов;

- зона № 2 для подготовки ПЦР;
- зона № 3 для проведения ПЦР и учета результатов.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится пробоподготовка и ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ не менее 30 мин.

7.2 Требования к персоналу

Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться специалистами, имеющими достаточную квалификацию.

7.3 Экстракция ДНК из клинического материала

Использование набора подразумевает работу с готовыми образцами ДНК, выделенными из клинического материала. В состав набора не входят реагенты для выделения ДНК.

Для выделения ДНК из клинических образцов рекомендуется использовать наборы реагентов, предназначенные для выделения ДНК из соответствующего клинического материала, и прошедшие государственную регистрацию (например, для выделения ДНК из образцов цельной крови – Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп», РУ ФСР 2008/03147, для выделения ДНК из образцов сухих пятен крови – Набор реагентов для выделения ДНК из клинического материала «Экстра-ДНК-Био», РУ ФСР 2012/13631).

В зоне № 1 проводят экстракцию ДНК согласно инструкции производителя. Полученные образцы ДНК хранят в течение года при температуре не выше минус 16 °С. Перед выполнением протокола рекомендуется оценить концентрацию ДНК, которая должна составлять от 10 до 100 нг/мкл.

7.4 Подготовка образцов и постановка ПЦР

7.4.1 Отобрать необходимое для проведения анализа число микропробирок объемом 0,2 мл или стрипированных пробирок, или планшет для ПЦР (в зависимости от числа проб и типа амплификатора).

Расчёт количества микропробирок производят по формуле: количество микропробирок = $n + 1$, где n – количество исследуемых образцов, включая 5 Калибраторов (K1, K2, K3, K4, K5) и отрицательный контроль К-.

7.4.2 Промаркировать микропробирки и расположить в штативе, надписи должны быть минимальными, не использовать маркер, который флуоресцирует при возбуждении светом, избегать надписей на поверхностях пластика, задействованных в детекции флуоресценции.

Маркировать пять пробирок для Калибраторов K1, K2, K3, K4, K5.

Маркировать пробирку для контроля К-.

7.4.3 В зоне № 2 разморозить при комнатной температуре следующие компоненты набора: Реагенты Amp1, Amp2, Калибраторы K1, K2, K3, K4, K5 и Контроль К-. Разморозить исследуемые образцы ДНК.

7.4.4 После размораживания исследуемых образцов, калибраторов, контроля К- содержимое пробирок тщательно перемешать четырёхкратным переворачиванием, затем встряхиванием на вортексе, не допуская образования пены; осадить капли в микроцентрифуге в течение 5 с.

7.4.5 Рассчитать необходимый объем компонентов для общей реакционной смеси, исходя из расчёта на необходимое число микропробирок, согласно формуле пункта 7.4.1. (табл. 2).

Таблица 2 – Компоненты реакционной смеси

| Компонент | Объем на одну реакцию |
|---------------|-----------------------|
| Реагент Amp 1 | 12,5 мкл |
| Реагент Amp 2 | 2,5 мкл |

7.4.6 Приготовить общую реакционную смесь.

7.4.7 Тщательно перемешать общую реакционную смесь встряхиванием на вортексе; осадить капли со стенок пробирок в микроцентрифуге в течение 5 с.

7.4.8 Внести по 15 мкл общей реакционной смеси во все пробирки (лунки планшета) для ПЦР в соответствии с числом исследуемых проб, включая Калибраторы, а также Контроль К-.

7.4.9 Добавить по 10 мкл ДНК исследуемых образцов в соответствующие пробирки для ПЦР.

7.4.10 Закрыть крышки пробирок для ПЦР, содержащих ДНК исследуемых образцов; осадить капли центрифугированием в микроцентрифуге в течение 10 с.

7.4.11 Добавить по 10 мкл калибраторов К1, К2, К3, К4, К5 в соответствующие пробирки/ячейки планшета ПЦР.

7.4.12 Добавить 10 мкл Контроля К- в соответствующую пробирку/ячейку планшета для ПЦР.**7.4.13** Закрыть крышки пробирок для ПЦР; осадить капли центрифугированием в микроцентрифуге в течение 10 с.

7.4.14 Перенести пробирки/планшет в зону №3.

7.4.15 Установить пробирки/планшет для ПЦР в блок амплификатора.

7.4.16 Запустить программное обеспечение (ПО) амплификатора. Открыть в ПО созданный ранее шаблон или ввести параметры ПЦР (табл. 3), запустить программу амплификации.

7.5 Регистрация результатов ПЦР

Детекцию продуктов амплификации проводят в режиме реального времени с использованием детектирующего ПЦР-амплификатора согласно инструкции к прибору.

По каналу FAM/Green регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК TREC, по каналу HEX/JOE/Yellow регистрируется сигнал накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК KREC, по каналу ROX/Orange регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена RPP30, по каналу Cy5/Red регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена HPRT.

По результатам определения TREC и KREC делают выводы о нормальном состоянии иммунитета пациента и предварительные выводы об отсутствии и/или снижении количества TREC и/или KREC. Для выявленных образцов с отсутствием или снижением уровня целевых молекул осуществляют подтверждение или опровержение полученного результата. Для этого проводят постановку ПЦР TREC и KREC повторно.

Таблица 3 – Условия проведения амплификации и детекции результатов

| Цикл | Температура, °С | Время | Измерение флуоресценции | Кол-во циклов |
|------|-----------------|--------|---|---------------|
| 1 | 95 | 15 мин | | 1 |
| 2 | 95 | 10 с | | 5 |
| | 61 | 30 с | | |
| | 72 | 15 с | | |
| 3 | 95 | 10 с | HEX/JOE/Yellow, FAM/Green, Cy5/Red, ROX/Orange | 40 |
| | 60 | 30 с* | | |
| | 72 | 15 с | | |

Примечание: * - детекция флуоресцентного сигнала

7.6 Анализ и интерпретация результатов ПЦР

7.6.1 Анализ данных включает следующие этапы:

- первичная обработка данных;
- контроль качества прохождения ПЦР;
- анализ исследуемых образцов.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на соответствующем канале с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции Калибраторов в логарифмической шкале), что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла Ct. Выделение ДНК и амплификация для анализируемого образца считаются выполненными успешно, если:

- графики нарастания флуоресценции на каналах ROX/Orange и Cy5/Red имеют форму экспоненциальной кривой;
- для пробы определено значение пороговых циклов Ct по каналам ROX/Orange и Cy5/Red;
- кривые флуоресценции по каналам ROX/Orange и Cy5/Red пересекают пороговые линии на участке экспоненциального роста.

7.6.2 Принцип интерпретации

Учет результатов следует начинать с результата амплификации Контроля К-.

7.6.2.1 Результаты анализа не учитываются, если:

– в пробирке с Контролем К- регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по одному из каналов, либо по всем каналам флуоресценции; в данной ситуации необходимо принятие мер для устранения контаминации в ПЦР-лаборатории и повторное исследование всех образцов;

– во время прохождения реакции детектирующий амплификатор не регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по любому из каналов (HEX/JOE/Yellow, FAM/Green, ROX/Orange, Cy5/Red) в пробирках с Калибраторами; в данной ситуации необходимо повторное исследование всех образцов;

– в пробирках с исследуемыми образцами не детектируется сигнал по каналам ROX/Orange и Cy5/Red, соответствующим внутреннему контролю (генам RPP30 и HPRT); в данном случае необходимо повторное исследование таких образцов, начиная с выделения ДНК.

7.6.2.2 Результаты анализа учитываются, если:

– во время прохождения амплификации отсутствует флуоресцентный сигнал по всем каналам в пробирке с Контролем К-;

– во время прохождения амплификации регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по всем каналам (HEX/JOE/Yellow, FAM/Green, ROX/Orange, Cy5/Red) в пробирках с Калибраторами;

– во время прохождения реакции детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам ROX/Orange и Cy5/Red в пробирках с исследуемыми образцами.

7.6.2.3 При соблюдении требований пункта 7.6.2.2 на основании значений порогового цикла «Ct» (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией) и исходя из заданных значений Калибраторов происходит автоматическое построение калибровочных прямых и расчет значений абсолютного количества копий аналита в реакции.

7.6.2.4 Полученные значения используют для расчета нормализованной концентрации ДНК TREC и KREC по отношению к эндогенному внутреннему контролю на 10^5 клеток по формулам 1а (для женщин), 1б (для мужчин):

$$(1a) \text{ TREC(KREC)}_{[\text{коп./}10^5 \text{ кл}]} = \left(\frac{\text{TREC(KREC)}_{[\text{коп./мл}]}}{\frac{\text{RPP30} + \text{HPRT}}{4}_{[\text{коп./мл}]}} \right) \times 100000;$$

$$(1б) \text{ TREC(KREC)}_{[\text{коп./}10^5 \text{ кл}]} = \left(\frac{\text{TREC(KREC)}_{[\text{коп./мл}]}}{\frac{\text{RPP30} + 2\text{HPRT}}{4}_{[\text{коп./мл}]}} \right) \times 100000,$$

где TREC (KREC), RPP30, HPRT – концентрации TREC (KREC), RPP30, HPRT, согласно калибровочным графикам;

$(RPP30 + HPRT)/4$, $(RPP30 + 2HPRT)/4$, – средняя концентрация ДНК генов домашнего хозяйства для женщин и мужчин, соответственно.

Затем полученные показатели сравнивают с референтными значениями для каждой возрастной категории.

7.6.2.5 Референтные (нормальные) значения концентраций TREC/KREC в различных возрастных группах.

Таблица 4 – Референтные граничные значения уровней концентрации TREC и KREC (копий/10⁵ кл.) у новорожденных

| | |
|---------------------|-----|
| TREC Нижняя граница | 892 |
| KREC Нижняя граница | 400 |

Таблица 5 – Референтные граничные значения уровней концентрации TREC и KREC (копий/10⁵ кл.) у взрослых людей в зависимости от возраста

| Возраст, лет | 18-29 | 30-39 | 40-49 | 50-59 | 60-69 | >70 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| TREC Нижняя граница | 45 | 32 | 18 | 14 | 12 | 11 |
| KREC Нижняя граница | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 |

7.6.2.6 По результатам определения TREC и KREC делают выводы о нормальном состоянии иммунитета пациента и предварительные выводы об отсутствии и/или снижении количества TREC и/или KREC. Для выявленных образцов с отсутствием или снижением уровня целевых молекул осуществляют подтверждение или опровержение полученного результата. Для этого проводят постановку ПЦР TREC и KREC повторно.

7.7 Предупреждения

Прием пациентом (матерью новорожденного) иммуносупрессивных препаратов, препаратов моноклональных антител, а также препаратов крови, переливание крови (за 2-3 месяца до проведения диагностики) могут привести к неверным результатам диагностики. Результаты ПЦР-исследования не могут интерпретироваться вне комплексной диагностики заболевания пациента.

8. Условия транспортирования и хранения МИ

Срок годности – 12 месяцев со дня утверждения службой качества производства, при соблюдении условий транспортирования и хранения. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

Транспортирование осуществляются любым видом крытого транспорта в пенопластовых контейнерах с гелевыми хладагентами при температуре 2–8 °С в течение не более 5 суток. После доставки МИ необходимо поместить реагенты на хранение в соответствии с указанным на упаковке температурным режимом.

Хранение до вскрытия и хранение после вскрытия для Реагентов Amp1, Amp2, Калибраторов K1, K2, K3, K4, K5 и Контроля К- осуществляются при температуре от минус 25 до минус 18 °С. Допускается трехкратное замораживание и размораживание компонентов Набора после вскрытия при применении. Допускается хранение компонентов Набора после вскрытия при применении при температуре 2–8 °С в течение не более 3 суток.

Набор реагентов, транспортировавшийся или хранившийся с нарушением температурного режима, с нарушением целостности упаковки предприятия-изготовителя, использованию не подлежит.

9. Указания по утилизации





Отходы, образующиеся в ходе применения МИ, утилизируются в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами. Упаковка набора, компоненты набора реагентов, оставшиеся неиспользованными по истечении срока годности набора реагентов, относятся к отходам класса А и утилизируются с бытовыми отходами.











Учитывая потенциальную инфекционную опасность исследуемых образцов и их отходов, следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом – остатки исследуемых образцов, не используемые для дальнейших исследований или биобанкирования, относятся к классу В (эпидемиологически опасным).

Утилизация, уничтожение, дезинфекция отходов проводятся 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», СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

10. Объяснение используемых символов

Таблица 6 – Объяснение символов, которые используются в маркировке

| Символ | Название символа | Значение символа |
|---|--------------------------------|---|
|  | Изготовитель | Рядом с символом указаны наименование и адрес изготовителя МИ |
|  | Дата изготовления | Рядом с символом указана дата изготовления МИ |
|  | Использовать до, срок годности | Рядом с символом указана дата, после которой МИ не должно применяться |
|  | Код партии | Рядом с символом указан код партии медицинского изделия, установленный производителем |

| Символ | Название символа | Значение символа |
|---|---|--|
|  | Предел температуры | Рядом с верхними и нижними горизонтальными линиями указаны границы температурного диапазона, в пределах которого МИ может быть применено без ущерба его безопасности |
|  | Обратитесь к инструкции по применению | Указывает на необходимость пользователя ознакомиться с инструкцией по применению |
|  | Медицинское изделие для диагностики in vitro | Указывает, что МИ является изделием для диагностики in vitro |
|  | Содержимого достаточно для проведения n тестов | Рядом с символом указано количество тестов, которые могут быть выполнены с использованием МИ |
|  | Специальный знак обращения медицинских изделий на рынке Евразийского экономического союза | Знак обращения свидетельствует о том, что МИ, маркированное им, прошло установленную в рамках Союза процедуру регистрации и подтверждения соответствия общим требованиям безопасности и эффективности МИ и требованиям к внедрению и поддержанию системы менеджмента качества МИ |
|  | Беречь от солнечных лучей | Указывает на необходимость защиты груза от воздействия солнечных лучей |
|  | Беречь от влаги | Указывает на необходимость защиты груза от воздействия влаги |
|  | Использовать при повреждении упаковки | Указывает, что в случае повреждения или вскрытия упаковки МИ применять нельзя |
|  | Верх | Указывает правильное вертикальное положение груза |
|  | Хрупкое. Осторожно | Указывает на необходимость осторожного обращения с грузом |

По вопросам, касающимся качества

Набора реagens для количественного определения эксцизионных колец TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (TREC/KREC-Amp PS), следует обращаться к предприятию-изготовителю

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
по адресу: 197101, Россия, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14

Телефон (812) 233-20-92, (812) 644-63-17, факс (812) 644-63-10

E-mail: pasteur@pasteurorg.ru;

Официальный веб-сайт: www.pasteurorg.ru



