



ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*

«ИММУНО-БИТ МУЛЬТИ»

Набор реагентов для выделения и количественного определения ДНК TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по ТУ 21.20.23-003-17608775-2021»

НАЗНАЧЕНИЕ

«ИММУНО-БИТ МУЛЬТИ» Набор реагентов для выделения и количественного определения ДНК TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по ТУ 21.20.23-003-17608775-2021» (далее по тексту – набор реагентов), предназначен для выделения и количественного определения ДНК TREC¹ и KREC² из образцов цельной крови или сухих пятен крови человека (далее по тексту – анализируемые образцы) методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени (далее по тексту – ПЦР-РВ).

Набор реагентов используется как вспомогательное средство для диагностики патологических состояний, вызванных недостатком Т- и В-клеток без градации по демографическому или популяционному признаку.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению: применять в соответствии с назначением.

Противопоказания к применению: не применимо.

Сокращенное наименование медицинского изделия для диагностики *in vitro*

«ИММУНО-БИТ МУЛЬТИ»

¹ TREC – T cell receptor (TCR) excision circles – эксцизионное кольцо Т-клеточного рецептора

² KREC - kappa-deleting recombination excision circle - рекомбинационное кольцо каппа-делеционного элемента

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ

Набор реагентов предназначен для выделения и количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и в сухих пятнах крови с целью оценки функционального состояния иммунной системы пациентов и скрининга иммунодефицитных состояний (ИДС) без градации по демографическому или популяционному признаку.

Молекулы TREC и KREC - стабильные кольцевые фрагменты ДНК, образующиеся в ходе перестройки генов рецепторов Т- и В-клеток, соответственно. У здоровых новорожденных TREC и KREC образуются в больших количествах, в то время как у детей с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью (ТКИН) и агаммаглобулинемией количество TREC и KREC значительно снижено или находятся на недетектируемом уровне. С возрастом, у детей и взрослых количество TREC и KREC падает. Количество TREC и KREC ниже нормы может указывать на клеточный или гуморальный иммунодефицит.

Анализ может быть проведен как с использованием цельной крови, так и сухих пятен крови.

ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Только для профессионального использования.

Сотрудники клинико-диагностических лабораторий медицинских учреждений и лабораторий службы крови.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

1 Состав набора реагентов

Набор реагентов выпускают в виде двух комплектов: в виде комплекта 1 (на 96 реакций) и комплекта 2 (на 384 реакций).

Комплект 1 и комплект 2 предназначены для ручной постановки анализа и с помощью автоматических станций для выделения нуклеиновых кислот (далее по тексту – автоматические станции) при условии, что запрограммирована последовательность действий, изложенная в данной инструкции.

Состав комплектов представлен в таблице 1.

Т а б л и ц а 1 – Состав набора реагентов

Наименование	Комплект 1	Комплект 2
Компоненты для выделения (Упаковка 1 из 2):		
«Буфер L» – лизирующий раствор – прозрачная бесцветная или бледно-желтая жидкость, возможно образование осадка в виде кристаллов.	1 фл. (53,0 мл)	4 фл. (по 53,0 мл)

Опасные вещества: изопропанол, гуанидин хлорид, гуанидин тиоционат, тритон X-100, 1-тиоглицерол		
«Буфер W1» – раствор для отмывки – прозрачная бесцветная жидкость, возможно образование осадка в виде кристаллов. Опасные вещества: изопропанол, гуанидин тиоционат	1 фл. (75,0 мл)	4 фл. (по 75,0 мл)
«Буфер W2» – раствор для отмывки – прозрачная бесцветная жидкость. Опасные вещества: изопропанол	1 фл. (75,0 мл)	4 фл. (по 75,0 мл)
«Буфер W3» – раствор для отмывки – прозрачная бесцветная жидкость. Опасные вещества: изопропанол	1 фл. (75,0 мл)	4 фл. (по 75,0 мл)
«Буфер E1» – раствор для элюции – прозрачная бесцветная жидкость. Консервант: натрия азид в концентрации не более 0,1 %	1 фл. (29,0 мл)	4 фл. (по 29,0 мл)
«МГС» – сорбент (магнетизированная силика) – суспензия. Консервант: натрия азид в концентрации не более 0,1 %	1 пр. (1,1 мл)	4 пр. (по 1,1 мл)
«Реагент А» – вспомогательный реагент для проведения лизиса – прозрачная бесцветная жидкость. Консервант: натрия азид в концентрации не более 0,1 %	1 пр. (1,1 мл)	4 пр. (по 1,1 мл)
«Реагент S» – раствор для лизиса – прозрачная бесцветная или бледно-желтая жидкость, возможно образование осадка в виде кристаллов. Опасные вещества: гуанидин тиоционат, тритон X-100, 1-тиоглицерол	1 фл. (31,0 мл)	4 фл. (по 31,0 мл)
Компоненты для ПЦР-РВ (Упаковка 2 из 2):		
«5×ПЦР-буфер» – буфер для полимеразной цепной реакции – прозрачная жидкость	1 пр. (0,6 мл)	4 пр. (по 0,6 мл)
«ПЦР-смесь» – смесь для полимеразной цепной реакции – прозрачная жидкость светло-фиолетового цвета	1 пр. (1,0 мл)	4 пр. (по 1,0 мл)
«Тaq-полимераза» - Таq полимераза – прозрачный бесцветный вязкий раствор	1 пр. (0,12 мл)	4 пр. (по 0,12 мл)
«К1» - калибратор 1 – прозрачная бесцветная жидкость	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)
«К2» – калибратор 2 – прозрачная бесцветная жидкость	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)
«К3» – калибратор 3 – прозрачная бесцветная жидкость	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)
«К4» – калибратор 4 – прозрачная бесцветная жидкость	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)
«К-» – отрицательный контроль – прозрачная бесцветная жидкость	1 пр. (0,15 мл)	1 пр. (0,15 мл)
Эксплуатационная документация		
Инструкция по применению набора реагентов	1 шт.	1 шт.

Примечания

1 Паспорт на серию входит в комплект поставки набора реагентов. Число экземпляров паспорта каждой серии, определено в договоре на поставку продукции.

2 Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам, входящим в состав набора реагентов, определена согласно ГОСТ ISO 17511-2011.

2 Число анализируемых образцов биологического материала

Набор реагентов предназначен для ручных и автоматических постановок анализа и рассчитан на выполнение 96 (комплект 1) или 384 (комплект 2) определений, включая калибраторы.

3 Принцип метода

Принцип метода основан на количественном определении содержания копий ДНК TREC и KREC с использованием процесса амплификации участков ДНК TREC и KREC с помощью специфических к этим участкам праймеров и гибридизационных зондов (флуоресцентно меченные зонды) и Taq ДНК-полимеразы с последующим определением накопления специфического флуоресцентного сигнала на амплификаторе с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

Выявление наличия или отсутствия ДНК TREC и KREC и их количественное определение в анализируемых образцах включает в себя две стадии:

- 1) выделение ДНК из анализируемых образцов, включающее лизис образцов, сорбцию ДНК на магнитные частицы, отмывки и элюцию;
- 2) амплификация методом ПЦР-PB, с использованием специфических праймеров и гибридизационных зондов.

Для контроля анализа в составе ПЦР-смеси предусмотрены праймеры и гибридизационные зонды, специфические для участка гена человека ALB³ (эндогенный внутренний контроль). Эндогенный внутренний контроль позволяет контролировать этапы выделения нуклеиновых кислот и проведения ПЦР, отсутствие в образце ингибиторов ПЦР, оценивать адекватность взятия и количество материала. С учетом эндогенного контроля происходит пересчет количества копий ДНК TREC и KREC в анализируемом образце.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

1. Диагностическая чувствительность

В ходе клинических испытаний при анализе 126 образцов клинического материала значение диагностической чувствительности составило 100,0 % (интервал 97,7-100,0, с доверительной вероятностью 95,0 %).

³ALB- Albumin- сывороточный альбумин

2. Диагностическая специфичность

В ходе клинических испытаний при анализе 172 образцов клинического материала значение диагностической специфичности (ДС) составило 100,0 % (интервал 98,3-100,0, с доверительной вероятностью 95,0 %).

3 Аналитическая специфичность

Набор использует технологию TaqMan с гибридизационными зондами для определения трех типов мишеней: одной контрольной реакции, которая определяет количество копий генов альбумина (ген ALB) и две реакции - на TREC и KREC. Праймеры и зонды были разработаны таким образом, чтобы избежать любой неспецифической амплификации ДНК, выделенной из цельной крови или сухих пятен крови. Анализ специфичности был проведен с использованием базы данных BLAST, чтобы убедиться, что праймеры и зонды, используемые в наборе реагентов, амплифицируют только последовательности ALB, TREC и KREC человека. Существенной гомологии с другими мишенями не найдено.

4 Воспроизводимость

Внутрисерийная воспроизводимость анализа была протестирована в ходе клинико-лабораторных испытаний с использованием одиннадцати положительных и четырнадцати отрицательных анализируемых образцов (цельная кровь с К2ЭДТА или К3ЭДТА или цитратом натрия или сухое пятно) в 5 повторях на наборах реагентов одной серии. Коэффициент вариации не превысил 10 % для образцов цельной крови и 25 % для образцов сухих пятен крови.

Межсерийная воспроизводимость анализа была протестирована в ходе клинико-лабораторных испытаний с использованием четырнадцати положительных и четырнадцати отрицательных анализируемых образцов (цельная кровь с К2ЭДТА или К3ЭДТА или цитратом натрия или сухое пятно) на 3 сериях набора реагентов. Коэффициент вариации не превысил 10 % для образцов цельной крови и 25 % для образцов сухих пятен крови.

5 Предел детекции

Предел детекции (LOD) набора реагентов с использованием панели стандартных контрольных образцов «СКО ДНК(+/-)TREC/KREC/ALB», аттестованной ОБТК предприятия, - составил:

- $1 \cdot 10^3$ копий ДНК TREC на 1 мл образца нуклеиновых кислот (далее по тексту – НК) после выделения,
- $1 \cdot 10^3$ копий ДНК KREC на 1 мл образца НК после выделения,
- $1 \cdot 10^3$ копий ДНК ALB на 1 мл образца НК после выделения.

6 Линейный диапазон

Линейный диапазон количественного определения копийности TREC, KREC и ALB, определенный с помощью «К1», «К2», «К3» и «К4», составляет от 1×10^3 до 1×10^7 копий/мл.

7 Интерферирующие вещества

При выделении НК из цельной крови и сухих пятен гемоглобин (до 160 мг/мл), триглицериды (до 50 мг/дл), общий билирубин (до 60 мг/дл) не влияют на результат анализа.

Гуанидин хлорид (до 50 мМ), гуанидин тиоцианат (до 50 мМ), этиловый спирт (до 5%), изопропиловый спирт (до 5%) – вещества, которые могут попадать в образец при выделении НК из образца цельной крови или сухого пятна не влияют на результат анализа.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 2б (Приказ МЗ РФ №4н от 06.06.2012 г.).

При работе с набором реагентов соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Утв. МЗ СССР 17 января 1991 г.), СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и с использованием методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» и СП 2.1.3678-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к эксплуатации помещений, зданий, сооружений, оборудования и транспорта, а также условиям деятельности хозяйствующих субъектов, осуществляющих продажу товаров, выполнение работ или оказание услуг».

К работе с набором реагентов допускают специально обученный персонал, прошедший дополнительное профессиональное обучение правилам безопасной работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и молекулярно-генетическим методам.

Компоненты набора реагентов «Буфер E1», «МГС» и «Реагент А» содержат в качестве консерванта не более 0,1 % натрия азида.

Изопропанол, входящий в состав компонентов «Буфер L», «Буфер W1», «Буфер W2» и «Буфер W3» обладает раздражающим действием. Следует избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. Использовать только в хорошо вентилируемом помещении!

Избегать разбрызгивания, вдыхания, проглатывания и попадания компонента на кожу, слизистые и в глаза! Беречь от источников воспламенения / нагрева / искр / открытого огня! При пожаре тушить огнетушителями на основе диоксида углерода, порошковым средством для тушения или водяной струей мелкого разбрызгивания. При борьбе с крупными пожарами применять водяную струю мелкого разбрызгивания или спиртоустойчивую пену. Полноструйная вода НЕ пригодна для тушения!

Гуанидин хлорид, входящий в состав компонента «Буфер L», гуанидин тиоцинат, входящий в состав компонентов «Буфер L», «Буфер W1» и «Реагент S» обладают раздражающим действием. Следует избегать разбрызгивания и попадания их на кожу и слизистые.

Тритон-х-100 входящий в состав компонентов «Буфер L» и «Реагент S» обладает раздражающим действием при попадании на кожу, при попадании в глаза вызывает необратимые последствия, токсичен для водных организмов с долгосрочными последствиями.

При проглатывании компонентов набора реагентов прополоскать полость рта, обратиться за медицинской помощью при плохом самочувствии. НЕ вызывать рвоту! При вдыхании компонентов набора реагентов выйти на свежий воздух, обратиться за медицинской помощью при плохом самочувствии. При попадании компонентов набора реагентов на кожу и/или одежду немедленно снять всю загрязненную одежду, промыть кожу проточной водой, обратиться за медицинской помощью при плохом самочувствии. При попадании компонентов набора реагентов в глаза осторожно промыть глаза проточной водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы (при наличии), если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. Немедленно обратиться за медицинской помощью!

Все реактивы, входящие в состав компонентов набора реагентов в используемых концентрациях, являются нетоксичными. При попадании данных растворов на кожу и слизистые промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

Все использованные материалы, инструменты и оборудование, рабочее место дезинфицировать в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

Обеззараживание и/или обезвреживание и утилизацию всех анализируемых образцов, компонентов и отходов набора реагентов, несущих потенциальную биологическую опасность, производить в соответствии с разделом «Утилизация набора реагентов» настоящей инструкции по применению. При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и

разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, ПРЕДУСМОТРЕННЫЕ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КОМБИНАЦИИ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

При ручной постановке анализа необходимо нижеперечисленное оборудование:

- специальный автоматический или ручной перфоратор для выбивания дисков из сухих пятен;
- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (далее по тексту - амплификатор): «CFX96» («Bio-Rad», США, РУ ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016г.) или «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ ФСР 2011/10229 от 03.03.2011г.) или «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ ФСР 2011/10228 от 03.03.2011г.) или «Rotor Gene» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010г.) или «Applied Biosystems QuantStudio 5» («Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд», Сингапур, РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 г.);
- бокс абактериальный воздушной среды 2-го класса биологической защиты;
- морозильная камера, поддерживающая температуру от минус 16 °С до минус 24 °С или холодильник с морозильной камерой, поддерживающий температуру от минус 16 °С до минус 24 °С.
- микроцентрифуга;
- термостат или термостатирующий шейкер, поддерживающие температуру $(80 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- встряхиватель для пробирок, типа вортекс (далее по тексту - вортекс);
- одноканальные полуавтоматические дозаторы пипеточные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 1 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов, погрешность измерения которых должна быть не более 3 %;
- штативы для микропробирок вместимостью 0,2 и 2,0 мл;
- контейнер для сбора и обеззараживания наконечников;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные;
- одноразовые наконечники для полуавтоматических одноканальных дозаторов пипеточных с аэрозольным барьером;
- пробирки одноразовые полипропиленовые вместимостью 1,5 – 2,0 мл;

– тонкостенные микропробирки, стрипы или планшеты, для ПЦР, рекомендуемые производителем амплификатора для ПЦР-РВ;

– магнитный штатив или магнитный стержень.

При постановке анализа на автоматической станции необходимо:

– специальный автоматический или ручной перфоратор для выбивания дисков из сухих пятен;

– автоматическая станция для выделения нуклеиновых кислот с принадлежностями для ПЦР исследований: процессор магнитных частиц для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков KingFisher Flex, производства «Термо Фишер Сайентифик Ой», Финляндия (РУ ФСЗ 2009/05562 от 13.02.2019г.), или анализатор автоматический модульный Freedom EVO с принадлежностями, производства «ТЕКАН Швайц АГ», Швейцария (РУ ФСЗ 2008/03047 от 04.07.2016г.) или станция дозирующая автоматическая Microlab STARlet с принадлежностями (РУ РЗН 2018/6981 от 04.09.2018), производства «Гамильтон Бонадуц АГ», Швейцария;

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (далее по тексту - амплификатор): «CFX96» («Bio-Rad», США, РУ ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016г.) или «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ ФСР 2011/10229 от 03.03.2011г.) или «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ ФСР 2011/10228 от 03.03.2011г.) или «Rotor Gene» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010г.) или «Applied Biosystems QuantStudio 5» («Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд», Сингапур, РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 г.);

– бокс абактериальной воздушной среды 2-го класса биологической защиты;

– морозильная камера, поддерживающая температуру от минус 16 °С до минус 24 °С или холодильник с морозильной камерой, поддерживающей температуру от минус 16 °С до минус 24 °С.

– микроцентрифуга;

– термостат или термостатирующий шейкер, поддерживающие температуру $(80 \pm 1) ^\circ\text{C}$;

– встряхиватель для пробирок, типа вортекс (далее по тексту - вортекс);

– одноканальные полуавтоматические дозаторы пипеточные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 1 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов, погрешность измерения которых должна быть не более 3 %;

- штативы для микропробирок вместимостью 0,2 и 2,0 мл;
- контейнер для сбора и обеззараживания наконечников;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные;
- одноразовые наконечники для полуавтоматических одноканальных дозаторов пипеточных с аэрозольным барьером;
- пробирки одноразовые полипропиленовые вместимостью 1,5 – 2,0 мл;
- тонкостенные микропробирки, стрипы или планшеты, для ПЦР, рекомендуемые производителем амплификатора для ПЦР-РВ.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Идентификацию и прослеживаемость анализируемых образцов проводить в соответствии с системой менеджмента качества лаборатории.

Внимание! Выделять НК из образцов цельной крови или сухих пятен крови человека необходимо с помощью «Компонентов для выделения», входящих в состав набора реагентов.

Забор цельной крови производить одноразовой иглой в специальную вакуумную систему (К2ЭДТА, К3ЭДТА или натрия цитратом 3,8%). Пробирку аккуратно перевернуть несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом.

Внимание! Нельзя замораживать образцы цельной крови!

Антикоагулянты: К2ЭДТА, К3ЭДТА и цитрат натрия человека не влияют на результаты анализа.

ВНИМАНИЕ! НЕЛЬЗЯ использовать для забора крови вакуумные системы, содержащие в качестве антикоагулянта соли гепарина!

В соответствии с «МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности», разработанные Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, перед выделением НК образцы цельной крови могут храниться и транспортироваться:

- в течение 6 часов при температуре от 2 до 8 °С или
- в течение 2 часов при температуре от 20 до 25 °С.

После хранения образцов нужно их доводить до комнатной температуры и переворачивать 3–6 кратным переворачиванием пробирки для перемешивания.

Сухие пятна крови (далее по тексту СПК) человека могут транспортироваться в условиях температуры окружающей среды, избегая попадания влаги и храниться в сухом месте при комнатной температуре в течение 24 месяцев.

Для приготовления СПК используют капли крови, взятые обычным образом из пятки у новорожденных или пункцией вены у детей и взрослых, которые наносят на тест бланк. Пятна цельной крови высушивают на воздухе.

Для выделения НК из цельной крови необходимо 100 мкл биологического образца.

Для выделения НК из СПК необходимо выбить 1 панч диаметром 6 мм.

Выделенные образцы НК из образцов цельной крови или СПК человека допускается хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 месяцев и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для хранения НК необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость после выделения НК в новую пробирку.

Объем образцов НК, выделенных из цельной крови или СПК человека, для проведения анализа ПЦР-РВ составляет 10 мкл.

ОЖИДАЕМЫЕ И ПРЕДСКАЗУЕМЫЕ ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ, СВЯЗАННЫЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Побочные эффекты, связанные с применением набора реагентов, такие как получение ложноположительных и ложноотрицательных результатов могут наблюдаться в следующих случаях:

Использование компонентов с истекшим сроком годности.

Использование «Компонентов для выделения» и «Компонентов для ПЦР-РВ» из наборов реагентов разных серий или смешивание их в процессе приготовления растворов.

Использование компонентов из наборов реагентов разных серий или смешивание их в процессе приготовления растворов.

Использование компонентов из наборов реагентов других производителей наборов реагентов.

Несоблюдение условий и сроков хранения вскрытых компонентов в случае частичной постановки.

Использование для приготовления растворов грязной посуды.

Несоблюдение условий хранения анализируемых образцов, которое может привести к разрушению анализируемого соединения или появлению в анализируемом образце веществ, искажающих результат анализа.

Неправильное дозирование растворов, которое приводит как к росту, так и к снижению регистрируемой флуоресценции.

Изменение концентрации раствора за счет испарения жидкости из открытого флакона с компонентом.

Использование оборудования, не прошедшего регламентированного периодического технического обслуживания и/или эксплуатирующегося не в соответствии с инструкцией по применению на данное оборудование.

Использование для работы с компонентами, анализируемыми и контрольными образцами грязных наконечников.

Внесение анализируемых образцов одним наконечником.

Использование для дезинфекции посуды, оборудования, материалов и рабочих поверхностей неразрешенных и/или оказывающих влияния на результат ПЦР-РВ дезинфицирующих средств. Рекомендуется использовать, например, дезсредства: хлорамин и другие хлорсодержащие средства.

Рекомендуется использовать неопудренные перчатки и одноразовые нарукавники.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ИЛИ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ К ЭТАПУ ВЫДЕЛЕНИЯ НК

***ВНИМАНИЕ!** При работе с биоматериалами необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free. Для проведения всех манипуляций использовать одноразовые наконечники с фильтрами.*

Предварительная подготовка образцов цельной крови

Предварительная подготовка образцов цельной крови не требуется.

Предварительная подготовка образцов сухих пятен крови

1 При хранении «Компонентов для выделения» при температуре от 2 до 8 °С, извлечь «Реагент S» из коробки и прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

2 Промаркировать по одной одноразовой пластиковой пробирке объемом 1,5 мл для каждого тест-бланка (сухого пятна).

3 Выбить с помощью специального автоматического перфоратора или ручного перфоратора для выбивания дисков из сухого пятна крови, выбить 1 панч диаметром 6 мм.

ВНИМАНИЕ! Выбитые диски должны быть полностью пропитаны кровью. Рекомендуется выбивать диски из центральной области СПК, не захватывая область ограничивающей краски. Рекомендуется выбивать диски непосредственно перед процедурой выделения НК.

ВНИМАНИЕ! Перед выбиванием дисков для каждого нового образца рекомендуется сделать 2-3 высечки на чистом участке фильтровальной бумаги, что позволит снизить риск контаминации нового образца фрагментами от предыдущих высечек. По завершении процедуры выбивания дисков проведите обработку лезвия перфоратора согласно его инструкции по применению.

- 4 Добавить к подготовленным образцам по 200 мкл «Реагента S».
- 5 Поместить промаркированные пробирки в термостат при температуре 65 °С на 30 минут, периодически встряхивая на вортексе.
- 6 Центрифугировать пробирки при 10 000 g в течение 1 мин на микроцентрифуге.
- 7 Отобрать полностью надосадочную жидкость в чистые промаркированные пробирки, не упираясь наконечником в диски и не захватывая бумажную основу.
- 8 Для выделения НК использовать 150 мкл жидкости. В случае, если конечный объем жидкости менее 150 мкл, то используют весь ее объем.

ПОДГОТОВКА «КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ» НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Для выделения НК из цельной крови или СПК человека использовать «Компоненты для выделения», входящие в состав набора реагентов.

1) Перемешать взбалтыванием «Буфер W1», «Буфер W2», «Буфер W3» и «Буфер E1». «Буфер L», прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов и перемешать взбалтыванием.

2) Перемешать «Реагент А» и осадить капли на вортексе.

3) Полностью ресуспендировать содержимое пробирку «МГС» на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную (без центрифугирования).

4) Приготовить в отдельной пробирке объемом 1,5 мл смесь, содержащую «Реагент А» и «МГС», на необходимое количество микропробирок *n*, согласно приведенной таблице 2.

Т а б л и ц а 2 – Приготовление смеси, содержащей «Реагент А» и «МГС»

Название компонента	Объем реагента на 1 образец	Объем реагента для анализа <i>n</i> микропробирок (с учётом 10% запаса объема)
«Реагент А»	10 мкл	$10 \times N \times 1,1$ мкл
«МГС»	10 мкл	$10 \times N \times 1,1$ мкл

Перемешать смесь, содержащую «Реагент А» и «МГС», осадить капли на вортексе.

Примечание - Допускается внесение всего содержимого пробирок с «Реагентом А» и «МГС» необходимого для проведения исследования 96 образцов, в «Буфер L». Полученную смесь тщательно перемешать взбалтыванием.

Хранение: неиспользованные и вскрытые компоненты «Буфер L», «Буфер W1», «Буфер W2», «Буфер W3», «Буфер E1», «Реагент А», «МГС» хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора реагентов.

ВЫДЕЛЕНИЕ НК ИЗ ОБРАЗЦОВ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ И ПОДГОТОВЛЕННЫХ ОБРАЗЦОВ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ

Общие требования:

1. Провести подготовку реагентов согласно пункту «Подготовка «Компонентов для выделения» набора реагентов».
2. Подготовить необходимое количество микропробирок объемом 1,5 мл, или необходимое количество ячеек картриджа, соответствующее количеству анализируемых образцов, промаркировать их.
3. Используйте для каждого образца отдельный наконечник.

Методика выделения НК с использованием автоматических дозирующих станций

ВНИМАНИЕ! При использовании автоматической станции для выделения НК необходимо ознакомиться с инструкцией по эксплуатации данной автоматической станции и запрограммировать последовательность действий, указанную ниже.

1. Подготовка к проведению процедуры выделения НК

1. Внести необходимое количество реагентов «Буфер L», «Буфер W1», «Буфер W2», «Буфер W3» и «Буфер E1» в соответствующие картриджи для реагентов автоматической станции.
2. При использовании автоматических дозирующих станций следует проводить процедуру выделения НК только из цельной крови или СПК, т.к. объем анализируемых образцов цельной крови и надосадочной жидкости после предобработки СПК различаются.

2. Процедура экстракции НК

1. Внести в каждую промаркированную пробирку объемом 1,5 мл или лунку планшета/картриджа (в зависимости от модели автоматической станции) по **20 мкл** подготовленной смеси, содержащей «Реагента А» и «МГС», и по **500 мкл «Буфера L»**.
2. Внести в пробирки 150 мкл или всю надосадочную жидкость (в случае, если конечный объем жидкости менее 150 мкл) после процедуры предобработки СПК. Перемешать образцы.
3. При использовании в качестве анализируемых образцов цельной крови внести по 100 мкл цельной крови. Перемешать образцы.

Внимание! Не следует одновременно проводить выделение НК из образцов СПК и цельной крови (см. пункт «Подготовка к проведению процедуры выделения НК»).

4. Прогреть образцы при температуре **60 °C** в течение **10 мин**, затем аккуратно перемешать содержимое.

5. Поместить пробирки или планшеты в магнитный штатив (далее по тексту – МШ) на **2 мин**.

6. Удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки или планшеты из МШ.

7. Добавить в образцы по **700 мкл «Буфера W1»**, перемешать содержимое, поместить в МШ на **2 мин**.

8. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 5.

9. Добавить в образцы по **700 мкл «Буфера W2»**, перемешать содержимое, поместить в МШ на **2 мин**. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 5.

10. Добавить в образцы по **700 мкл «Буфера W3»** и удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки или планшеты из МШ, содержимое **не** перемешивать.

11. Добавить в образцы по **100 мкл «Буфера E1»**, перемешать.

12. Прогреть при температуре **80 °C** в течение **5 мин** с включенным перемешиванием.

13. Поместить пробирки или планшеты в МШ на **2 мин**.

14. Перенести надосадочную жидкость в новые пробирки или планшеты.

15. Элюат содержит выделенные образцы НК. Пробы готовы к постановке реакции ПЦР-РВ.

Методика выделения НК с использованием автоматических станций с магнитной головкой

1. Подготовка к проведению процедуры выделения НК

1. Приготовить и промаркировать 5 глубокодонных планшетов для реагентов: «Буфер L», «Буфер W1», «Буфер W2», «Буфер W3» и «Буфер E1».

2. Внести необходимое количество реагентов в каждую лунку соответствующих глубокодонных планшетов:

- 700 мкл «Буфер W1»,

- 700 мкл «Буфер W2»,

- 700 мкл «Буфер W3»,

- 100 мкл «Буфер E1».

3. Внести в планшет для реагента «Буфер L» по 20 мкл подготовленной смеси, содержащей «Реагент А» и «МГС», и по 500 мкл «Буфера L».

4. Внести в лунки планшета для реагента «Буфер L» анализируемые образцы: 100 мкл цельной крови или 150 мкл или всю надосадочную жидкость (в случае, если конечный объем жидкости менее 150 мкл) после процедуры предобработки СПК. Используйте для каждого образца отдельный наконечник.

5. Поместить новую насадку на магнитную головку (далее по тексту – МГ) в планшет для хранения насадки. Поместить все планшеты в автоматическую станцию согласно протоколу.

2. Процедура экстракции НК

1. Перемешать образцы.

2. Прогреть планшет при температуре 60 °С в течение 10 мин, затем аккуратно перемешать содержимое.

3. Поместить МГ в планшет с образцами и реагентом «Буфер L»: на 2 мин.

4. Переместить МГ с магнитными частицами в планшет для «Буфера W1», перемешать содержимое в течении 2 мин.

5. Переместить МГ с магнитными частицами в планшет для «Буфера W2», перемешать содержимое в течении 2 мин.

6. Переместить МГ с магнитными частицами в планшет для «Буфера W3», содержимое планшета **не** перемешивать.

7. Переместить МГ с магнитными частицами в планшет для «Буфера E1».

8. Прогреть планшет при температуре 80 °С в течение 5 мин с включенным перемешиванием.

9. Удалить МГ с магнитными частицами.

10. Элюат в лунках планшета с «Буфером E1» содержит выделенные образцы НК. Пробы готовы к постановке реакции ПЦР-РВ.

Ручная методика выделения НК с использованием магнитного штатива или центрифугирования

1. Внести в каждую пробирку объемом 1,5 мл для анализируемых образцов по 20 мкл подготовленной смеси, содержащей «Реагент А» и «МГС» и по 500 мкл «Буфера L».

2. Внести в пробирки по 100 мкл цельной крови или 150 мкл или всю надосадочную жидкость (в случае, если конечный объем жидкости менее 150 мкл) после процедуры предобработки СПК. Перемешать на вортексе.

3. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин.

4. Перемешать содержимое пробирок на вортексе.

5. Центрифугировать пробирки при 10 000 g в течение **1 мин** или поместить пробирки в МШ на 2 мин.

6. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость.

7. Добавить в пробирки по **700 мкл «Буфера W1»**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе.

8. Центрифугировать пробирки при 10 000 g в течение **1 мин** или поместить пробирки в МШ на 2 мин. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 6.

9. Добавить в пробирки по **700 мкл «Буфера W2»**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе.

10. Центрифугировать пробирки при 10 000 g в течение **1 мин** или поместить пробирки в МШ на 2 мин. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 6.

11. Не вынимая пробирки из МШ, добавить в пробирки по 700 мкл «Буфера W3». Содержимое пробирок **не** перемешивать.

12. Центрифугировать пробирки при 10 000 g в течение 1 мин. или поместить пробирки в МШ на 30 сек. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 6.

13. Добавить в пробирки по **100 мкл «Буфера E1»**, перемешать на вортексе.

14. Поместить пробирки в термостат с температурой **80 °C** на **5 мин**, перемешивая каждые **2 мин**.

15. Центрифугировать пробирки при 10 000 g в течение **1 мин** или поместить пробирки в МШ на 2 мин.

16. Надосадочная жидкость содержит выделенные образцы НК. Пробы готовы к постановке ПЦР-РВ.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных ДНК для проведения дальнейшего ПЦР-исследования осуществляется без снятия пробирок с МШ или незамедлительно после центрифугирования. Если в течение 3 мин после центрифугирования проба не внесена в реакцию, необходимо провести повторное центрифугирование и перенести образцы НК в чистые промаркированные пробирки. Если не планируется постановка ПЦР сразу после выделения НК, то ее переносят в новую пробирку и хранят до постановки реакции при температуре от 2 до 8°C в течение 7 дней, при температуре от минус 24 до минус 16°C в течение 16 месяцев и при температуре не выше 68°C в течение года.

ПОДГОТОВКА ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ПЦР-РВ

Для проведения анализа ПЦР-РВ с помощью компонентов для ПЦР-РВ с использованием амплификатора, необходимо его подготовить заранее в соответствии с руководством по эксплуатации.

ПОДГОТОВКА «КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ ПЦР-РВ» НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Подготовка «ПЦР-смесь», «5×ПЦР-буфер», «К1», «К2», «К3», «К4» и «К-»

«5×ПЦР-буфер», «ПЦР-смесь», «К1», «К2», «К3», «К4» и «К-» готовы к использованию.

Перед применением все растворы необходимо разморозить при комнатной температуре, аккуратно перемешать и осадить капли с крышки пробирки кратким центрифугированием в течение 1-3 с.

Хранение: неиспользованные и вскрытые компоненты «5×ПЦР-буфер», «ПЦР-смесь», «К1», «К2», «К3», «К4» и «К-» хранить при температуре от минус 16 до минус 24 °С в течение срока годности набора реагентов.

Подготовка «Taq-полимераза»

«Taq-полимераза» готова к использованию.

Перед применением аккуратно перемешать и осадить капли с крышки пробирки кратким центрифугированием в течение 1-3 секунд.

ВНИМАНИЕ! «Taq-полимераза» не требует размораживания, пробирку хранить в морозильной камере при температуре от минус 16 до минус 24 °С. При приготовлении реакционной смеси добавлять «Taq-полимеразу» в последнюю очередь. Длительное хранение при комнатной температуре критически влияет на активность фермента.

Хранение: неиспользованные и вскрытые компоненты «Taq-полимераза» хранить при температуре от минус 16 до минус 24 °С в течение срока годности набора реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-РВ

ВНИМАНИЕ! Хранить приготовленную реакционную смесь при температуре (2-8) °С в течение 2 часов.

Подготовка микропробирок или планшетов для амплификации

ВНИМАНИЕ! При работе с НК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free. Для внесения в пробирки/лунки планшета реагентов, проб НК, калибраторов и отрицательного контроля использовать одноразовые наконечники с фильтрами

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования

Подготовка микропробирок/ планшета ПЦР	Расчет количества микропробирок (N) или лунок планшета производится по формуле: N= n + 5, где n – количество выделенных анализируемых образцов, 5 – калибраторы и отрицательный контроль (5 шт.) – «K1», «K2», «K3», «K4» и «K-». При необходимости калибраторы и отрицательный контроль можно поста- вить в двух повторах: Тогда N = n + 10, где n – количество выделенных анализируемых образцов, 10 – калибраторы и отрицательный контроль в двух повторах каждый – 2 x «K1», 2 x «K2», 2 x «K3», 2 x «K4» и 2 x «K-». В случае использования микропробирок отобрать необходимое для проведе- ния анализа число пробирок или стрипованных пробирок, промаркировать и расположить в штативе.		
ВНИМАНИЕ! В зависимости от используемого оборудования для проведения ПЦР-РВ надписи на пробирках следует располагать таким образом, чтобы они не мешали детектированию флуорес- центного сигнала. См. руководство по использованию амплификатора для проведения ПЦР-РВ.			
Приготовление реакционной смеси	В пробирке объемом 1,5 - 2 мл смешать реагенты для приготовления реак- ционной смеси из расчета на необходимое количество микропробирок/лунок планшета N, согласно приведенной ниже таблице.		
	Название реагента	Объем реагента на одну реакцию (мик- ропробирку/лунку)	Объем реагента для анализа N микропробирок/лунок (с учётом 10% запаса объ- ема)
	«5×ПЦР-буфер»	5 мкл	5×N×1,1 мкл
	«ПЦР-смесь»	9 мкл	9×N×1,1 мкл
	«Taq-полимераза»	1 мкл	1×N×1,1 мкл
	Перемешать приготовленную реакционную смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратким центрифугированием (1-3 с).		
Внесение реакци- онной смеси	В каждую микропробирку/лунку внести по 15 мкл реакционной смеси		
Внесение образ- цов в про- бирки/лунки с реакционной смесью	Внесение образцов в пробирки/лунки с реакционной смесью необходимо осуществлять в следующей последовательности (для исключения контаминации): 1. 10 мкл «K-» 2. по 10 мкл выделенных образцов НК 3. 10 мкл «K4» 4. 10 мкл «K3» 5. 10 мкл «K2» 6. 10 мкл «K1» Планшет заклеить пленкой для ПЦР. В случае использования микропробирок закрыть крышки. Перед постановкой в амплификатор рекомендуется осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием (1-3 с). При постановке калибраторов и отрицательного контроля в двух повторах п.п. 1, 3-6 выполнить в двух повторах без внесения изменения последовательности внесения образцов в плашки.		
Регистрация результатов анализа	Выполнить в соответствии с «Процедурой измерения и оценки результата»		

Процедура измерения и оценка результата

Ввести в прибор для ПЦР-РВ программу проведения амплификации и детекции флуоресцентных сигналов:

Количество циклов	Температура (°C)	Время	Измерение флуоресценции в каналах
1	95	15 мин	-
5	95	10 с	-
	60	30 с	-
	72	15 с	-
	95	10 с	-
40	60	30 с	FAM/Green, R6G/JOE/HEX/VIC/Yellow и ROX/Orange
	72	15 с	-

Для детектирования сигнала при амплификации ДНК TREC и KREC в наборе реагентов используются гибридизационные зонды, меченные, соответственно, флюорофорами ROX и R6G соответственно. Для детектирования сигнала при амплификации ALB (эндогенный внутренний контроль) в системе используется гибридизационный зонд, меченный флюорофором FAM. Для детекции следует выбирать три канала детекции FAM/Green, R6G/JOE/HEX/VIC/Yellow и ROX/Orange.

Канал детекции	FAM/Green	R6G/JOE/HEX/VIC/Yellow	ROX/Orange
Мишень	ALB	KREC	TREC

Запрограммировать положение пробирок с калибраторами, отрицательным контролем, анализируемыми образцами согласно инструкциям по эксплуатации к соответствующему амплификатору для ПЦР-РВ, задать значения концентраций «К1», «К2», «К3» и «К4», указанные в приложении к паспорту набора реагентов. Концентрации анализируемых образцов будут высчитаны автоматически прибором.

Поместить пробирки в амплификатор.

Запустить программу и провести ПЦР-РВ с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

РАСЧЕТЫ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР-РВ в соответствии с инструкцией к прибору.

1 Условия правильности работы набора реагентов

В калибраторах прибор должен фиксировать:

- нарастание сигнала флуоресценции в канале ROX и определять значение порогового цикла Ct в канале ROX;
- нарастание сигнала флуоресценции в канале R6G и определять значение порогового цикла Ct в канале R6G;
- нарастание сигнала флуоресценции в канале FAM и определять значение порогового цикла Ct в канале FAM.

В отрицательном контроле прибор НЕ должен фиксировать:

- нарастание сигнала флуоресценции в канале ROX и определять Ct в канале ROX;
- нарастание сигнала флуоресценции в канале R6G и определять Ct в канале R6G;
- нарастание сигнала флуоресценции в канале FAM и определять Ct в канале FAM.

В каждом анализируемом образце прибор должен фиксировать:

- нарастание сигнала флуоресценции в канале FAM и определять Ct в канале FAM.

2 Учет результатов анализа

На основании значений порогового цикла Ct (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией) и исходя из заданных значений калибраторов («K1», «K2», «K3», «K4»)⁴ происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений копий TREC, KREC и ALB в образце для анализа ПЦР (см. руководство к соответствующему амплификатору для ПЦР-PB).

Условия регистрации результатов:

2.1 Для отрицательного контроля:

- значение Ct в каналах FAM, R6G и ROX должно быть более 39 циклов или не определяться;
- если значение Ct в каналах FAM и/или R6G и/или ROX меньше или равно 39, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР-PB считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ.

2.2 Для калибраторов «K1», «K2», «K3» и «K4»:

- полученные значения Ct, должны укладываться в диапазон значений, приведенный в приложении к паспорту набора реагентов;
- эффективность амплификации должна находиться в пределах от 95 до 105%, а коэффициент корреляции R^2 – не меньше 0,97;

⁴ Значения концентрации калибраторов и значения Ct указаны в Паспорте.

– в случае если значение C_t не укладываются в диапазон значений, приведенный в приложении к паспорту набора реагентов, результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР-РВ считаются недостоверными. Требуется перестановка ПЦР для всех проб;

– если коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной кривой меньше 0,97 требуется перестановка ПЦР для всех проб.

2.3 Концентрация ДНК ALB должна быть более 10^5 копии/мл в анализируемых образцах. В случае, если концентрация ДНК ALB менее 10^5 копии/мл в анализируемых образцах, требуется повторить анализ начиная с этапа выделения ДНК из цельной крови/СПК человека.

3 Интерпретация результатов анализа

Необходимо рассчитать количество копий TREC (KREC) на 10^5 ядер-содержащих клеток (лейкоцитов) с учетом внутреннего контроля ALB по формуле 1:

$$\text{Кол-во TREC (KREC)} = \frac{\text{кол-во копий TREC (KREC) на мл}}{\text{кол-во копий ALB}} * 200\,000 \quad (1)$$

Референсные значения для разных возрастных групп приведены в приложении к паспорту.

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ ОТСУТСТВУЮТ (ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗИРУЕМЫЙ ОБРАЗЕЦ), ЕСЛИ:

- значение TREC (KREC), рассчитанное по формуле 1, равно или более граничного референсного значения возрастной группы, внутри которой находится пациент, сдавший цельную кровь/СПК человека.

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ ПРИСУТСТВУЮТ (ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗИРУЕМЫЙ ОБРАЗЕЦ), ЕСЛИ:

- C_t анализируемого образца не определяется;

- значение TREC (KREC), рассчитанное по формуле 1, менее граничного референсного значения возрастной группы, внутри которой находится пациент, сдавший цельную кровь/СПК человека.

Внимание! Данный набор реагентов нельзя использовать для постановки диагноза.

При получении положительного результата (наличие патологического состояния, вызванного недостатком лимфопозза Т- и В- клеток) при анализе СПК, провести повторную процедуру выделения и амплификации из образца СПК, в случае, если при повторном

анализе будет получен положительный результат, необходимо по возможности провести исследование для данного пациента из цельной крови.

При получении положительного результата (наличие патологического состояния, вызванного недостатком лимфопоэза Т- и В- клеток) дальнейшие действия выполнять на усмотрение лечащего врача.

4 Ограничения теста

Проведенный анализ может быть сомнительным у пациентов, принимающих препараты моноклональных антител; у пациентов, если матери во время беременности принимали иммуносупрессивные препараты, а также прошедших процедуру переливания крови (за два месяца до анализа), или получавших препараты крови в течение последних двух-трех месяцев.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЙ

Для проведения входного контроля качества изделия и периодического внутрилабораторного контроля качества исследований лаборатория может использовать образцы сухих пятен крови от людей, с установленным в анамнезе и подтвержденного другими методами иммунодефицитным состоянием, сопровождающимся снижением количества KREC/TREC и людей с содержанием в крови KREC/TREC в пределах установленных норм. При выявлении в ходе проведения входного контроля качества изделия и периодического внутрилабораторного контроля качества исследований снижения аналитических характеристик изделия (не подтверждение для внутрилабораторных контрольных образцов ранее установленных характеристик, неадекватная работа калибраторов) информируют производителя.

УТИЛИЗАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

В процессе использования набора реагентов и утилизации наборов реагентов с истекшим сроком годности токсичные отходы не образуются.

Отходы, образующиеся в процессе использования набора реагентов, и наборы реагентов с истекшим сроком годности относить к классу Б.

Обращение (сбор, временное хранение, обеззараживание и/или обезвреживание и транспортирование) отходов, образующихся в процессе использования и утилизации набора реагентов с истекшим сроком годности, проводить согласно СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосфер-

ному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Для обеззараживания и/или обезвреживания отходов в соответствии с МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» использовать зарегистрированные в РФ дезсредства и оборудование в соответствии с инструкциями по их применению.

Отходы утилизировать через организации, имеющие лицензию на этот вид деятельности.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Срок годности набора реагентов – 12 месяцев с даты изготовления, указанной на этикетке.

Срок годности вскрытых компонентов набора реагентов – 12 месяцев с даты изготовления, указанной на этикетке.

Срок годности приготовленной реакционной смеси для ПЦР-РВ - 2 часа при температуре от 2 до 8 °С.

Смесь для выделения НК, приготовленную из «Буфера L», «Реагента А» и «МГС», хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 2 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

«Компоненты для выделения» набора реагентов («Упаковка 1 из 2») необходимо хранить и транспортировать в оригинальной упаковке в соответствии с СанПиН 3.3686–21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» раздел XLVIII «Условия транспортирования и хранения иммунобиологических препаратов» при температуре от 2 до 25 °С в течение срока годности. Замораживание не допускается!

«Компоненты для ПЦР-РВ» набора реагентов («Упаковка 2 из 2») необходимо хранить и транспортировать в оригинальной упаковке в соответствии с СанПиН 3.3686–21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» раздел XLVIII «Условия транспортирования и хранения иммунобиологических препаратов» при температуре от минус 16 до минус 24°С в течение срока годности.

Допускается однократное транспортирование «Компонентов для ПЦР-РВ» набора реагентов («Упаковка 2 из 2») при температуре от 2 до 8 °С не более 7 суток.

Набор реагентов эксплуатировать при следующих условиях:

- температура окружающей среды (17 – 27) °С;
- относительная влажность воздуха (не более 70) %;
- атмосферное давление (84,0 – 106,7) кПа / (630 – 800) мм. рт. ст.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых наборов реагентов требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество набора реагентов гарантируются в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки набора реагентов, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил применения, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, обращаться в АО «ГЕНЕРИУМ» 601125, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Заводская, стр. 273, e-mail: OAMD@generium.ru, по тел./ф. +7 (49243) 72-5-20, +7 (49243) 72-5-14. Рекламации принимаются в письменном виде на бумажном носителе (или в виде скан-копии, направленной на электронную почту организации), заверенном подписью уполномоченного лица и печатью организации.

Символы, применяемые для маркировки набора реагентов

Символ	Наименование символа	Символ	Наименование символа
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020			
	Использовать до		Обратитесь к инструкции по применению
	Дата изготовления		Осторожно!
	Код партии		Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Не допускать воздействия солнечного света		Содержимого достаточно для проведения 96 и 384 тестов, соответственно
	Беречь от влаги		Предел температуры

ГОСТ 31340-2013

Символы	Заявления об опасности	Меры предосторожности
«Буфер L»		
   	H225: Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. H302: Вредно при проглатывании. H311: Токсично при контакте с кожей. H312: Вредно при контакте с кожей. H315: Вызывает раздражение кожи. H319: Вызывает серьезное раздражение глаз. H332: Вредно при вдыхании H336: Может вызывать вялость или сонливость. H411: Токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями. H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями. EUN032: При контакте с кислотами освобождаются очень токсичные газы.	P210: Хранить адали от источников тепла, горячих поверхностей, искр, открытого пламени и других источников воспламенения. Не курить. P233: Хранить в плотно закрытой таре. P241: Использовать взрывобезопасное электрическое оборудование. P242: Используйте только не искрящие инструменты. P261: Избегать вдыхания паров. P264: Вымойте руки после работы тщательно. P270: Не есть, не пить и не курить в процессе использования этого продукта. P271: Используйте только на открытом воздухе или в хорошо вентилируемом помещении. P273: Избегать попадания в окружающую среду. P280: Пользоваться защитными перчатками и средствами защиты глаз. P303+P361+P353: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы) Немедленно снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой или принять душ. P305+P351+P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. При наличии контактных линз снять их и продолжить промывание водой. P312: Обратиться к врачу при плохом самочувствии. P332+P313: При раздражении кожи: обратиться к врачу. P337+P313: Если раздражение глаз не проходит, обратиться за медицинской консультацией. P362+P364: Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед повторным использованием. P370+P378: В случае пожара: Использовать огнетушитель для тушения. P403+P235: Хранить в прохладном, хорошо вентилируемом месте. P501: Утилизировать содержимое в соответствии с национальными правилами СанПин 2.1.3684-21.

«Буфер W1»		
 	H225: Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. H302: Вредно при проглатывании. H312: Вредно при контакте с кожей. H319: Вызывает серьезное раздражение глаз. H332: Вредно при вдыхании H336: Может вызывать вялость или сонливость. H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями. EUN032: При контакте с кислотами освобождаются очень токсичные газы.	P210: Хранить вдали от источников тепла, горячих поверхностей, искр, открытого пламени и других источников воспламенения. Не курить. P233: Хранить в плотно закрытой таре. P241: Использовать взрывобезопасное электрическое оборудование. P242: Используйте только не искрящие инструменты. P261: Избегать вдыхания паров. P264: Вымойте руки после работы тщательно. P271: Используйте только на открытом воздухе или в хорошо вентилируемом помещении. P273: Избегать попадания в окружающую среду. P280: Пользоваться защитными перчатками и средствами защиты глаз. P303+P361+P353: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): Немедленно снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой или принять душ. P305+P351+P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. При наличии контактных линз снять их и продолжить промывание водой. P312: Обратиться к врачу при плохом самочувствии. P337+P313: Если раздражение глаз не проходит, обратиться за медицинской консультацией. P370+P378: В случае пожара: Использовать огнетушитель для тушения. P403+P235: Хранить в прохладном, хорошо вентилируемом месте. P501: Утилизировать содержимое в соответствии с национальными правилами СанПиН 2.1.3684-21.
«Буфер W2» и «Буфер W3»		
 	H225: Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. H319: Вызывает серьезное раздражение глаз. H336: Может вызывать вялость или сонливость.	P210: Хранить вдали от источников тепла, горячих поверхностей, искр, открытого пламени и других источников воспламенения. Не курить. P233: Хранить в плотно закрытой таре. P241: Использовать взрывобезопасное электрическое оборудование. P242: Используйте только не искрящие инструменты. P261: Избегать вдыхания паров. P264: Вымойте руки после работы тщательно. P271: Используйте только на открытом воздухе или в хорошо вентилируемом помещении. P280: Пользоваться защитными перчатками и средствами защиты глаз. P303+P361+P353: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): Немедленно снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой или принять душ. P305+P351+P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. При наличии контактных линз снять их и продолжить промывание водой. P312: Обратиться к врачу при плохом самочувствии. P337+P313: Если раздражение глаз не проходит, обратиться за медицинской консультацией. P370+P378: В случае пожара: Использовать огнетушитель для тушения. P403+P235: Хранить в прохладном, хорошо вентилируемом месте. P501: Утилизировать содержимое в соответствии с национальными правилами СанПиН 2.1.3684-21.

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ РУЧНОЙ МЕТОДИКИ

ВНИМАНИЕ! При выделении НК с помощью автоматических станций необходимо следовать алгоритму инструкции, описанному в соответствующих разделах.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ К ЭТАПУ ВЫДЕЛЕНИЯ НК

1. Прогреть «Реагент S» при температуре 65 °C до полного растворения кристаллов.
2. Выбить с помощью специального перфоратора 1 панч диаметром 6 мм.
3. Добавить к подготовленным образцам по 200 мкл «Реагента S».
4. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °C на 30 минут, периодически встряхивая на вортексе.
5. Центрифугировать пробирки при 10 000 g в течение 1 мин.
6. Отобрать полностью надосадочную жидкость в чистые промаркированные пробирки, не упираясь наконечником в диски.
7. Для выделения НК использовать 150 мкл или всю надосадочную жидкость (в случае, если конечный объем жидкости менее 150 мкл).

ПОДГОТОВКА К ВЫДЕЛЕНИЮ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1. Перемешать взбалтыванием «Буфер W1», «Буфер W2», «Буфер W3» и «Буфер E1», «Реагент A», тщательно ресуспендировать содержимое пробирки с «МГС» на вортексе. «Буфер L», прогреть при температуре 65 °C до полного растворения кристаллов и перемешать взбалтыванием
2. Приготовить в отдельной пробирке объемом 1,5 мл смесь, содержащую «Реагент A» и «МГС», на необходимое количество микропробирок:

Название компонента	Объем реагента на 1 образец	Объем реагента для анализа и микропробирок (с учётом 10% запаса объема)
«Реагент A»	10 мкл	$10 \times N \times 1,1$ мкл
«МГС»	10 мкл	$10 \times N \times 1,1$ мкл

3. Перемешать смесь, осадить капли на вортексе.

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

1. Внести в пробирки с образцами: по 20 мкл смеси, содержащей «Реагент A» и «МГС» и по 500 мкл «Буфера L»
2. Внести в пробирки по 100 мкл цельной крови или 150 мкл или всю надосадочную жидкость (в случае, если конечный объем жидкости менее 150 мкл) после процедуры предобработки сухих пятен крови, перемешать на вортексе.
3. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °C на 10 мин, перемешать на вортексе.
4. Поместить пробирки в магнитный штатив на 2 мин (или центрифугировать при 10000 g в течение 1 мин).
5. Отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок магнитных частиц.
6. Добавить в пробирки по 700 мкл «Буфера W1». Перемешать на вортексе.
7. Поместить пробирки в магнитный штатив на 2 мин (или центрифугировать при 10000 g в течение 1 мин).
8. Отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок магнитных частиц.
9. Добавить в пробирки по 700 мкл «Буфера W2». Перемешать на вортексе.
10. Поместить пробирки в магнитный штатив на 2 мин (или центрифугировать при 10000 g в течение 1 мин).
11. Отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок магнитных частиц.
12. Добавить в пробирки по 700 мкл «Буфера W3», содержимое пробирок не перемешивать.
13. Поместить пробирки в магнитный штатив на 30 сек. (или центрифугировать при 10000 g в течение 1 мин)
14. Отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок магнитных частиц.
15. Добавить в пробирки по 100 мкл «Буфера E1», перемешать на вортексе.
16. Поместить пробирки в термостат с температурой 80 °C на 5 мин, перемешивая каждые 2 мин.
17. Поместить пробирки в магнитный штатив на 2 мин (или центрифугировать при 10000 g в течение 1 мин).
18. Надосадочная жидкость содержит выделенные образцы НК. Пробы готовы к постановке ПЦР-РВ.

ПОДГОТОВКА К ПЦР АНАЛИЗУ

1. Подготовить амплификатор заранее в соответствии с руководством по эксплуатации.
2. Разморозить «5×ПЦР-буфер», «ПЦР-смесь», «K1», «K2», «K3», «K4» и «K-» при комнатной температуре, перемешать и осадить капли с крышки.
3. **Внимание!** «Тaq-полимераза» не требует размораживания. При приготовлении реакционной смеси добавлять «Тaq-полимеразу» в последнюю очередь. Перед применением аккуратно перемешать и осадить капли с крышки.

ПОДГОТОВКА МИКРОПРОБИРОК/ПЛАНШЕТА

Калибраторы и отрицательный контроль в одной лунке:

Рассчитать количество микропробирок/лунок (N) по

Калибраторы и отрицательный контроль в двух лунках:

Рассчитать количество микропробирок/лунок (N) по

формуле: $N = n + 5$

где n – количество анализируемых образцов,
5 – «K1», «K2», «K3», «K4» и «K-»

формуле: $N = n + 10$

где n – количество анализируемых образцов,
10 – 2х «K1», «K2», «K3», «K4» и «K-»

Внимание! Надписи на пробирках следует располагать таким образом, чтобы они не мешали детектированию флуоресцентного сигнала

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ

Внимание! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР

1. В пробирке объемом 1,5-2 мл смешать реагенты из расчета на необходимое количество N проб:

Название реагента	Объем реагента на одну реакцию	Объем реагента для анализа N проб (с учётом 10% запаса объема)
«5×ПЦР-буфер»	5 мкл	$5 \times N \times 1,1$ мкл
«ПЦР-смесь»	9 мкл	$9 \times N \times 1,1$ мкл
«Taq-полимераза»	1 мкл	$1 \times N \times 1,1$ мкл

2. Перемешать приготовленную реакционную смесь на вихрексе и осадить капли с крышки

ВНЕСЕНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ, КАЛИБРАТОРОВ, ОТРИЦАТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ И АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Калибраторы и отрицательный контроль в одном повторе:

1. В каждую микропробирку/лунку внести по 15 мкл реакционной смеси
2. Внесение образцов в пробирки/лунки с реакционной смесью необходимо осуществлять в следующей последовательности (для исключения контаминации):

- 10 мкл «K-»
- по 10 мкл выделенных образцов НК
- 10 мкл «K4»
- 10 мкл «K3»
- 10 мкл «K2»
- 10 мкл «K1»

5. Планшет заклеить пленкой для ПЦР.

В случае использования микропробирок закрыть крышки. Перед постановкой в амплификатор рекомендуется осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием (1-3 с)

Калибраторы и отрицательный контроль в двух повторях:

1. В каждую микропробирку/лунку внести по 15 мкл реакционной смеси
2. Внесение образцов в пробирки/лунки с реакционной смесью необходимо осуществлять в следующей последовательности (для исключения контаминации):

- 10 мкл «K-»
- 10 мкл «K-»
- по 10 мкл выделенных образцов НК
- 10 мкл «K4»
- 10 мкл «K4»
- 10 мкл «K3»
- 10 мкл «K3»
- 10 мкл «K2»
- 10 мкл «K2»
- 10 мкл «K1»
- 10 мкл «K1»

5. Планшет заклеить пленкой для ПЦР.

В случае использования микропробирок закрыть крышки. Перед постановкой в амплификатор рекомендуется осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием (1-3 с)

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

1. Ввести программу в амплификатор («CFX96», «ДТпрайм», «ДТлайт», «Rotor Gene», «Applied Biosystems QuantStudio 5»):

Количество циклов	Температура (°C)	Время	Измерение флуоресценции в каналах
1	95	15 мин	-
5	95	10 с	-
	60	30 с	-
	72	15 с	-
40	95	10 с	-
	60	30 с	FAM/Green, R6G/JOE/HEX/VIC/Yellow и ROX/Orange
	72	15 с	-

2. Для детекции следует выбирать три канала детекции:

Канал детекции	FAM/Green	R6G/JOE/HEX/VIC/Yellow	ROX/Orange
Мишень	ALB	KREC	TREC

3. Запрограммировать положение пробирок с контрольными и анализируемыми образцами согласно рекомендациям к соответствующему амплификатору

4. Задать значения концентраций «K1», «K2», «K3», «K4» и «K-», указанные в приложении к паспорту набора реагентов.

5. Поместить пробирки в амплификатор, запустить программу и провести ПЦР-РВ

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для «К» Ct в каналах FAM, R6G и ROX должно быть более 39 циклов или не определяться
Для «К1», «К2», «К3» и «К4» Ct должны укладываться в диапазон значений, приведенный в приложении к паспорту, эффективность амплификации от 95 до 105%, R2 – не меньше 0,97
Для анализируемых образцов концентрация ДНК ALB должна быть более 10^5 копии/мл
Количество копий TREC (KREC) рассчитывается по формуле:

$$\text{Кол-во TREC (KREC)} = \frac{\text{кол-во копий TREC (KREC) на мл}}{\text{кол-во копий ALB}} \cdot 200\,000$$

Референсные значения для разных возрастных групп приведены в приложении к паспорту.

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ ОТСУТСТВУЮТ, ЕСЛИ:

- значение TREC (KREC), рассчитанное по формуле 1, равно или более граничного референсного значения возрастной группы, внутри которой находится пациент, сдавший цельную кровь/сухое пятно крови человека.

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ ПРИСУТСТВУЮТ, ЕСЛИ:

- Ct анализируемого образца не определяется;
- значение TREC (KREC), рассчитанное по формуле 1, менее граничного референсного значения возрастной группы, внутри которой находится пациент, сдавший цельную кровь/сухое пятно крови человека.

При получении положительного результата (наличие патологического состояния, вызванного недостатком лимфоцитов Т- и В- клеток) при анализе СПК, провести повторную процедуру выделения и амплификации из образца СПК, в случае, если при повторном анализе будет получен положительный результат, необходимо по возможности провести исследование для данного пациента из цельной крови.

Внимание! При получении положительного результата (наличие патологического состояния, вызванного недостатком Т- и В- клеток) дальнейшие действия выполнять на усмотрение лечащего врача.

Данный набор реагентов нельзя использовать для постановки диагноза.

Дата создания: 15.04.2022 г.

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

И.К. Варнавичус
«15» апреля 2022 г.


Пршито пронумеровано скреплено
печатью на (30) листах
Генеральный директор
ООО «АВ-ТЕСТ»

Д.В.Шверда



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 30 ЛИСТОВ
« 15 апреля 2022 » год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавинус Н.К.

