



**Набор для определения реаранжировок генов
иммуноглобулинов методом вертикального
электрофореза**

Инструкция по применению

вер. декабрь 2020 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

V(D)J-рекомбинация (V(D)J-recombination) — механизм соматической рекомбинации ДНК, происходящий на ранних этапах дифференцировки лимфоцитов и приводящий к формированию антиген-распознающих участков иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора. Гены иммуноглобулина (Ig) и Т-клеточного рецептора (TCR) состоят из повторяющихся сегментов, принадлежащих к трем классам: V (variable), D (diversity) и J (joining). В процессе V(D)J-перестройки генные сегменты, по одному из каждого класса, соединяются вместе. Объединенная последовательность сегментов V(D)J кодирует переменные домены каждой из цепей рецептора или иммуноглобулина. По реаранжировкам генов тяжелой цепи иммуноглобулинов (IgH), легких цепей к (Igk) и λ (Igl) выявляют В-клеточную клональность и используют данный тест для подтверждения диагноза В-клеточной лимфомы. Метод обладает высокой чувствительностью и позволяет выявить наличие клона в опухолевой ткани у подавляющего большинства (до 99 %) пациентов с В-клеточными лимфомами. Набор реагентов предназначен для качественного выявления реаранжировок генов иммуноглобулинов методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Анализируемым материалом является ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови или из сухих пятен крови. Набор предназначен для профессионального использования и служит вспомогательным средством для диагностики пациентов с подозрением на лимфопролиферативную опухоль.

Набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и

научно–исследовательской практике.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип метода

Метод выявления реаранжировок генов иммуноглобулинов основан на проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в ПААГ методом вертикального электрофореза. Для анализа требуется проведение ПЦР в 8 пробирках на одного пациента:

Пробирка	Гены	Сегменты гена, участвующие в реаранжировке
A	Гены тяжелых цепей иммуноглобулинов (IGH)	VH FR1-JH
B		VH FR2-JH
C		VH FR3-JH
D		DH-JH
E		DH7-JH
IGK-A	Гены легких цепей иммуноглобулинов каппа	Vκ-Jκ
IGK-B		Vκ/intron-Kde
IGL	Гены легких цепей иммуноглобулинов лямбда	Vλ-Jλ

- *ОКО* представляет собой геномную ДНК, не имеющую реаранжировок генов иммуноглобулинов.

2.2 Состав набора и форма выпуска

Набор рассчитан на проведение 50 тестов, включая негативный контроль.

Набор поставляется в пластиковом контейнере. Все реагенты разлиты в пластиковые герметичные флаконы с цветовой кодировкой этикеток и крышек.

Все компоненты набора готовы к использованию, в составе набора отсутствуют лиофилизованные компоненты.

В состав набора входит:

Название	Описание	Объем, мкл	Кол-во (шт)
A	Прозрачная жидкость	1100	2
B	Прозрачная жидкость	1100	2
C	Прозрачная жидкость	1100	2
D	Прозрачная жидкость	1100	2
E	Прозрачная жидкость	1100	2
IGK-A	Прозрачная жидкость	1100	2
IGK-B	Прозрачная жидкость	1100	2

IGL	Прозрачная жидкость	1100	2
Тақ-полимераза	Прозрачная жидкость	170	1
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная жидкость	700	1
Инструкция по применению	–	–	1
Паспорт	–	–	1

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности.
2. Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. При попадании на кожу или слизистые оболочки компонентов набора место контакта необходимо промыть большим количеством воды.
3. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2012 г. № 4н).
4. При использовании набора необходимо пользоваться одноразовыми перчатками, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером.

5. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
6. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.
7. Анализ проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах).
8. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.
9. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после начала работ облучаться ультрафиолетовым светом.
10. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.
11. Ключевой мерой предосторожности при работе с набором является соблюдение требований, изложенных в ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», утвержденном Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2007 г.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Амплификатор.
2. Микроцентрифуга типа «Вортекс».

3. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, 100 мкл и 1000 мкл.
4. Стерильный ламинарный шкаф.
5. Холодильник с морозильной камерой от -24 до -16°C.
6. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл.
7. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
8. Стерильные микропробирки для ПЦР объемом 0,1 - 0,2 мкл.
9. Автоматические пипетки переменного объема.
10. Камера для вертикального электрофореза.
11. Трансиллюминатор.

5. МАТЕРИАЛ ДЛЯ АНАЛИЗА

В качестве образца необходимо использовать геномную ДНК, выделенную из периферической крови или косного мозга. Возможно использование ДНК, выделенной из сухих пятен крови, собранных на ФТА картах.

6. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Транспортирование набора необходимо производить с хладоэлементами не допуская длительного (более 12 час размораживания). Необходимо избегать многократного (более 20 циклов) замораживания-размораживания. Транспортировка набора реагентов может производиться в термоконтейнерах с соблюдением необходимых температурных режимов всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами, установленными на данном виде транспорта.

Транспортировка и хранение должны осуществляться в упаковке предприятия-изготовителя в сухом, защищенном от света месте в течение всего срока годности с соблюдением необходимых температурных режимов.

Набор реагентов, транспортировавшийся или хранившийся с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

7. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора составляет 12 месяцев с даты производства при соблюдении условий транспортировки и хранения. Нельзя использовать набор после установленной даты окончания срока годности. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетке для невскрытых реагентов.

8. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ

Набор предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом.

9. ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

а. Подготовка реагентов

Все компоненты набора готовы к использованию.

б. Процедура тестирования

1. Довести все компоненты набора до комнатной температуры, кроме Taq-полимеразы, тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать 5 сек при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для сброса капель с крышек пробирок.

2. Смешать каждую из 8 реакционных смесей с необходимым объемом Taq-полимеразы в соотношениях, указанных ниже для анализа N проб (в расчет включены постановки ОКО):

Объем смеси = $34,5 \cdot (N+1)$;

Объем Taq-полимеразы¹ = $0,4 \cdot (N+1)$.

Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать 5 сек при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для сброса капель с крышек пробирок.

3. Отобрать необходимое количество микропробирок для ПЦР. Расчет количества микропробирок осуществляется исходя из того, что каждый образец исследуется в восьми ПЦР-смесях, кроме того, осуществляется постановка ОКО.
4. Внести в каждую микропробирку для ПЦР по 35 мкл соответствующей реакционной смеси.
5. Разморозить исследуемые образцы и ОКО.
6. Внести в пробирки с реакционными смесями по 15 мкл исследуемых образцов ДНК² и ОКО, используя наконечники с аэрозольным барьером. Пробирки кратковременно перемешать на вортексе.
7. Поместить пробирки в амплификатор. Установить программу амплификации (см. таблицу 1).

¹Taq-полимеразу необходимо использовать непосредственно из морозильной камеры. После добавления в реакционные смеси немедленно убирать в морозильную камеру. **Не размораживать!!!**

²Рекомендуемое количество вносимой в смесь ДНК находится в диапазоне 20-100 нг.

Таблица 1 - Протокол ПЦР

Цикл	Шаг	Повторов	Время	Температура
1	1	1	5 мин	95°C
2	1	35	30 с	95°C
	2		60 с	60°C
3	1	1	10 мин	60°C
4	1	1	5 мин	95°C
5	1	1	5 мин	15°C

с. Проведение электрофореза в ПААГ

Электрофорез является заключительным этапом проведения ДНК-диагностики. Необходимо провести вертикальный электрофорез анализируемых фрагментов ДНК на 6% полиакриламидном геле. Для определения размера продуктов необходимо использовать маркер молекулярного веса фрагментов ДНК (от 50 до 1000 п.о.). Для интерпретации результатов проводят оценку размеров образующихся продуктов в соответствующих смесях. В таблице 2 приведены размеры продуктов, соответствующие клональным продуктам.

Таблица 2 - Размеры продуктов, которые выявляются при наличии клона В-лимфоцитов

Пробирка	Сегменты гена	Размер продукта, п.о.		
IGH				
A	VH FR1-JH	310-360		
B	VH FR2-JH	250-295		
C	VH FR3-JH	100-170		

D	DH-JH	110-290	390-420	
E	DH7-JH	100-130		
IGK				
A	V _κ -J _κ	120-160	190-210	260-300
B	V _κ /intron-Kde	210-250	270-300	350-390
IGL				
IGL	V _λ -J _λ	140-165		

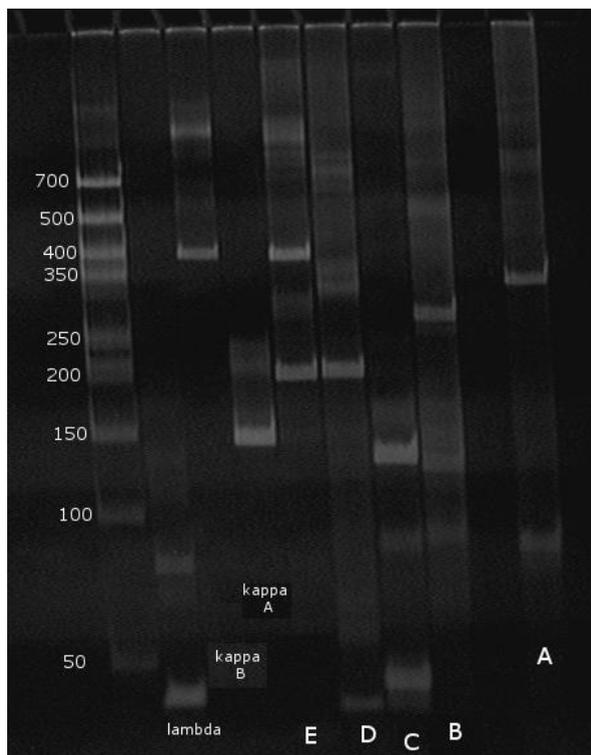


Рисунок 1. Пример электрофореграммы пациента с выявленным клоном В-лимфоцитов в пробирках А, В, С, D, E, карра А, карра В.

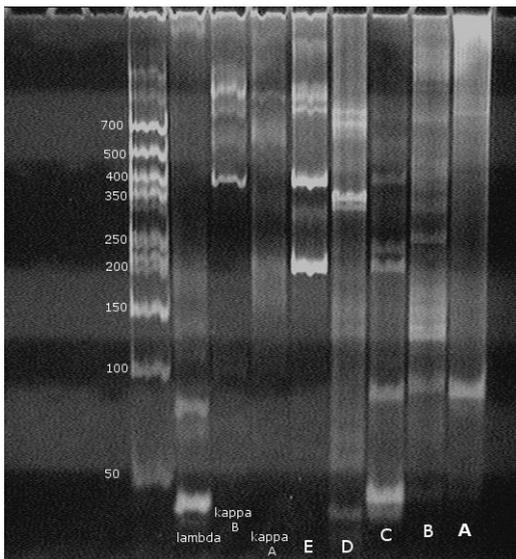


Рисунок 2. Пример электрофореграммы пациента без выявленного клона В-лимфоцитов.

Для оценки результатов анализа рекомендуем использовать международный протокол BIOMED-2³.

10. ОГРАНИЧЕНИЯ

Данный тест не должно рассматриваться как единственный критерий для диагностики. Так же, как и при любом другом диагностическом тестировании, все результаты должны быть интерпретированы вместе с клиническими данными, которыми

³van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia. 2003;17(12):2257-2317. doi:10.1038/sj.leu.2403202

располагает врач.

11. УТИЛИЗАЦИЯ (УНИЧТОЖЕНИЕ) И ДЕЗИНФЕКЦИЯ

При работе с исследуемыми образцами и отходами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом.

Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утвержденных департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998 г.). Нормы контроля, дезинфекции и утилизации изложены в Постановлении Главного государственного санитарного врача РФ от 9 декабря 2010 г. №163 «Об утверждении СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Дезинфекцию, а также утилизацию или уничтожение наборов реагентов и отходов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

Возможные типы отходов:

- все компоненты набора реагентов, оставшиеся неиспользованными по истечении срока годности набора реагентов, и упаковочная тара (класс А);

- использованные в ходе работы набора реагентов компоненты (класс Б);
- выделенная ДНК в элюирующем растворе, не используемая для дальнейших исследований или архивного хранения (класс Б);
- ампликат, образовавшийся после проведения ПЦР (класс Б).

Компоненты набора реагентов, оставшиеся неиспользованными по истечении срока годности, имеют класс опасности А на основании СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Сбор отходов класса А осуществляется в многоразовые емкости или одноразовые пакеты. Цвет пакетов может быть любой, за исключением желтого и красного. Одноразовые пакеты располагаются на специальных тележках или внутри многоразовых контейнеров. Емкости для сбора отходов и тележки должны быть промаркированы "Отходы. Класс А". Заполненные многоразовые емкости или одноразовые пакеты доставляются с использованием средств малой механизации и перегружаются в маркированные контейнеры, предназначенные для сбора отходов данного класса, установленные на специальной площадке (помещении).

Компоненты, использованные в ходе работы набора реагентов, и выделенная ДНК в элюирующем растворе, не используемая для дальнейших исследований и архивного хранения, имеют класс опасности Б на основании СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую и/или

фармацевтическую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

Отходы класса Б собираются в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокальваемую) упаковку (контейнеры) желтого цвета или имеющие желтую маркировку. Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов.

Для сбора органических, жидких отходов класса Б должны использоваться одноразовые непрокальваемые влагостойкие емкости с крышкой (контейнеры), обеспечивающей их герметизацию и исключающей возможность самопроизвольного вскрытия.

12. ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Не применимо.

13. ТЕКУЩИЙ РЕМОНТ

Не применимо.

14. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям ТУ при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.

По вопросам качества набора следует обращаться в ООО «Формула гена» по фактическому адресу: 660036, Россия, г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, строение 45, офис 102, тел. +7(391)290-55-13, e-mail: mail@formulagena.ru.

ООО «Формула гена»
г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, стр. 45, оф. 101
тел. +7(391)290-55-13
mail@formulagena.ru
formulagena.ru