



PML::RARA dif

набор реагентов для качественного выявления химерного транскрипта PML::RARA с дифференцировкой места слияния методом ПЦР в режиме реального времени

Инструкция по применению

вер. май 2023 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

В 1977 г. J.D. Rowley и соавт. было доказано, что практически во всех случаях острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ) обнаруживается транслокация $t(15;17)(q22;q12-21)$. В результате этой транслокации ген промиелоцитарного лейкоза (PML-ген), расположенный на хромосоме 15, переносится на длинное плечо хромосомы 17 в область, где находится ген альфа-рецептора ретиноевой кислоты. В результате $t(15;17)$ появляется 2 сливных аномальных гена: PML::RARA на деривате хромосомы 15 и RARA::PML на деривате хромосомы 17. Анализ на наличие транслокации PML::RARA является обязательным при диагностике ОПЛ (Клинические рекомендации по диагностике и лечению ОПЛ, 2020 г.).

Набор реагентов предназначен для качественного выявления химерного транскрипта PML::RARA (с дифференцировкой вариантов слияния bcr1, bcr2, bcr3) методом ПЦР в режиме реального времени. Анализируемым материалом является кДНК, полученная с помощью обратной транскрипции из РНК, выделенной из лейкоцитов цельной крови или костного мозга. Результатом анализа является установление наличия или отсутствия химерного транскрипта PML::RARA в образце человека. Набор предназначен для профессионального использования и служит вспомогательным средством для диагностики пациентов с подозрением на острый лейкоз.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип метода

Метод выявления химерного транскрипта PML::RARA основан на:

- Амплификации с детекцией в режиме «реального времени» с использованием зондов TaqMan. Результат амплификации регистрируется по каналам флуоресценции FAM, HEX и ROX. В качестве гена «домашнего хозяйства» (внутренний контроль) используется ген ABL1.
- Для анализа требуется проведение ПЦР в двух пробирках на одного пациента:
 1. Химерный транскрипт PML::RARA – смесь «PML-RARa» (каналы FAM, HEX и ROX);
 2. Ген ABL1 - смесь «ABL» (канал HEX).
- Для всех пробирок определяется порог обнаружения флуоресцентного сигнала (Ct) (необходимо использовать расчет Ct согласно инструкции программного обеспечения используемого прибора).
- Наличие или отсутствие мутации определяется по значению Ct (см. **Анализ и учет результатов**).
- ПКО представляет собой вектор с участком ДНК, несущим исследуемую транслокацию (вариант слияния bcr3) и ген внутреннего контроля.
- ОКО представляет собой вектор с участком ДНК, не несущим исследуемую транслокацию.

2.2 Состав набора и форма выпуска

Набор рассчитан на проведение 50 тестов, включая позитивный и

негативный контроли.

Набор реагентов «PML::RARA dif» выпускается в одном варианте исполнения.

Набор реагентов «PML::RARA dif» выпускается в одной комплектации.

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 лиофилизированные компоненты.

В состав набора входит:

Название	Описание	Объем, мкл	Кол-во (шт)
ABL	Прозрачная жидкость	900	1
PML-RARa	Прозрачная жидкость	900	1
Taq-полимераза	Прозрачная жидкость	65	1
Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная жидкость	200	1
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная жидкость	200	1
Инструкция по применению	—	—	1
Паспорт	—	—	1

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Контроль работы набора. Каждый набор снабжен внутренним контролем, который представляет собой смесь (с маркировкой «ABL»), содержащую праймеры, специфичные к участку гена «домашнего хозяйства» ABL1.

Чувствительность. Аналитическая чувствительность метода составляет 3 копии химерного транскрипта PML::RARA в реакции ПЦР.

Специфичность. Анализ надежно выявляет только транслокацию PML::RARA.

4. 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.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Амплификатор детектирующий.
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 заворачивающиеся 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.

6. МАТЕРИАЛ ДЛЯ АНАЛИЗА

В качестве образца необходимо использовать кДНК, полученную после проведения реакции обратной транскрипции из РНК, выделенной из периферической крови или костного мозга.

7. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Транспортирование набора необходимо производить с холодоэлементами 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.

8. 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.

9. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ

Набор предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом.

10. ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

10.1 Подготовка реагентов

Все компоненты набора готовы к использованию.

10.2 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. Подготовить необходимые объемы реакционной смеси для N

проб согласно таблице 3. В расчёт включены постановки ОКО и ПКО. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать 5 сек при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для сброса капель с крышек пробирок.

Таблица 3. Расчёт необходимого количества ПЦР-смесей для анализа N-проб

Смесь	Кол-во смеси, мкл	Кол-во Taq-полимеразы, мкл	Общее кол-во микропробирок для ПЦР
PML-RARa	$(N+2)*15$	$(N+2)*0,5$	$(N+2)*2$
ABL	$(N+2)*15$	$(N+2)*0,5$	

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

3. Отобрать необходимое количество микропробирок для ПЦР. Расчет количества микропробирок осуществляется исходя из того, что каждый образец исследуется в двух ПЦР-смесях (ABL, PML-RARa), кроме того, осуществляется постановка ПКО и ОКО (таблица 3).
4. Внести в каждую микропробирку для ПЦР по 15 мкл соответствующей реакционной смеси.
5. Разморозить исследуемые образцы, ПКО и ОКО.
6. Внести в пробирки с реакционными смесями по 10 мкл исследуемых образцов кДНК, ПКО и ОКО, используя наконечники с аэрозольным барьером. Пробирки кратковременно перемешать на вортексе.
7. Поместить пробирки в амплификатор. Установить программу амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 4).

Таблица 4. Протокол ПЦР

Цикл	Шаг	Повторов	Время	Температура	Камера
1	1	1	5 мин	95°C	
2	1	50	15 с	95°C	
	2		60 с	60°C	Включена (FAM, HEX и ROX каналы)

Установить следующие каналы считывания флюоресценции:

- Смесь «PML-RARa»:
 - канал FAM – тип слияния bcr1;
 - канал ROX – тип слияния bcr2;
 - канал HEX – тип слияния bcr3;
- Смесь «ABL» – HEX.

10.3 Анализ и учет результатов

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией к прибору.

1. Определить пороговый цикл (Ct) для каждой пробирки. Необходимо использовать расчет Ct согласно инструкции программного обеспечения используемого прибора. При наличии нелинейной области флюоресценции на первых циклах ПЦР рекомендуется воспользоваться функцией программного обеспечения для удаления первых нескольких

циклов амплификации¹.

2. Пороговый цикл смеси ОКО должен быть более 40*, иначе результаты всех исследуемых образцов считаются недостоверными.
3. Пороговый цикл пробирок ПКО (по каналу HEX) должен быть менее 35*, иначе результаты всех исследуемых образцов считаются недостоверными.
4. Пороговые циклы всех пробирок не должны быть менее 15*. Несоблюдение этого условия указывает на избыточное количество кДНК, добавленное в пробу. Необходимо повторить анализ с предварительным разведением кДНК.
5. Пороговый цикл смеси ABL исследуемых образцов должен быть менее 26*. Несоблюдение этого условия указывает на недостаточное количество кДНК, добавленное в пробу. Необходимо повторить анализ с этапа выделения РНК.
6. Оптимальный пороговый цикл смеси ABL от 18* до 23*.
7. Образец считается положительным по наличию химерного транскрипта PML::RARA, если пороговый цикл на одном или более каналов детекции (FAM, HEX, ROX) в пробирке со смесью PML-RARa менее 35. Тип слияния определяется по типу положительного канала: FAM – bcr1, ROX – bcr2, HEX – bcr3. Часто наблюдается наличие несколько мест слияний в одной исследуемой пробе.

¹ Например, в программном комплексе *CFX Manager* (для приборов *Bio-Rad CFX*) выбрать в меню «*Settings->Cycles to Analyze*» и установить начальный цикл, начинающийся в линейной области.

* Величина этого параметра зависит от используемой модели амплификатора. В настоящей инструкции приведены значения для прибора CFX96 (BioRad).

11. ОГРАНИЧЕНИЯ

Этот тест дает качественные результаты и показывает присутствие мутации в образце, что не должно рассматриваться как единственный критерий для диагностики острого лейкоза. Так же, как и при любом другом диагностическом тестировании, все результаты должны быть интерпретированы вместе с клиническими данными, которыми располагает врач.

12. 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-РВ (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.

13. ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Не применимо.

14. ТЕКУЩИЙ РЕМОНТ

Не применимо.

15. 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