

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Л.Богдан

« » декабря 2020 г.

Регистрационный № 120-1120



**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ
ОТДЕЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ, ВОВЛЕКАЮЩИХ ИММУННЫЙ
МЕХАНИЗМ, У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ**
(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии», государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»

АВТОРЫ: Полякова Е.А., Купчинская А.Н., к.м.н., доцент Гнедько Т.В.,
Капралова В.И., к.б.н., доцент Белевцев М.В.

Минск, 2020

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра

_____ Е. Л. Богдан
29.12.2020

Регистрационный № 120-1120

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ОТДЕЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ,
ВОВЛЕКАЮЩИХ ИММУННЫЙ МЕХАНИЗМ, У НЕДОНОШЕННЫХ
НОВОРОЖДЕННЫХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», ГУ «Республиканский научно-практический центр “Мать и дитя”»

АВТОРЫ: Е. А. Полякова, А. Н. Купчинская, канд. мед. наук, доц. Т. В. Гнедько, В. И. Капралова, канд. биол. наук, доц. М. В. Белевцев

Минск 2020

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК —	дезоксирибонуклеиновая кислота
ПЦР-РВ —	полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
Трис —	химическое соединение трис (гидроксиметил) аминометан (HOCH_2) ₃ CNH_2
ALB —	альбумин
DB —	лизирующий буфер
TREC —	эксцизионное кольцо Т-клеточного рецептора
KREC —	эксцизионное кольцо рекомбинации каппа
ТЭ-буфер —	буферный раствор, состоящий из Трис и ЭДТА

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод диагностики врожденного дефекта T- и B-лимфоцитов у недоношенных новорожденных детей на основании определения количественного содержания эксцизионных колец T- и B-клеточного рецептора методом мультиплексной ПЦР-РВ, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику отдельных нарушений, вовлекающих иммунный механизм.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-гематологов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с отдельными нарушениями, вовлекающими иммунные механизмы, в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) условиях отделений дневного пребывания.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Микроцентрифуга для пробирок типа эппендорф до 14 000 об/мин.
2. Морозильная камера.
3. Спектрофотометр.
4. Дырокол.
5. Термомиксер.
6. Вортекс.
7. Компьютер с программным обеспечением для управления прибором ПЦР-РВ, хранения данных и анализа.
8. Дозаторы переменного объема (0,1–10; 20–200; 100–1000 мкл).
9. Одноразовые наконечники с фильтром (до 10, 100, 200, 1000 мкл).
10. Одноразовые пробирки (0,2 мкл–1,5 мл).
11. Одноразовая пластиковая посуда для постановки ПЦР-РВ, микропробирки, стрипы, 96-луночные плашки (посуда должна подходить к прибору, на котором выполняют постановку ПЦР-РВ).

Реактивы

1. Вода деионизованная.
2. Изопропанол.
3. Ацетат аммония 8M.
4. Лизирующий буфер.
5. Флуоресцентно-меченные праймеры для амплификации генов альбумина TREC, KREC.
6. Двукратный мастер микс для ПЦР-РВ с флуоресцентной пробой.
7. ТЭ-буфер.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (МКБ-10: D80-D89).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод диагностики отдельных нарушений, вовлекающих иммунный механизм посредством определения количества копий TREC и KREC и при необходимости иммунологического исследования клеточного и гуморального иммунитета с определением субпопуляций Т- и В-лимфоцитов у недоношенных новорожденных имеет важную диагностическую значимость, так как позволяет выявить первичный иммунодефицит у ребенка в неонатальном периоде.

Подготовка материала для исследования

В качестве материала для исследования используют сухие пятна крови на фильтровальной бумаге. Образец крови берут из пятки новорожденного ребенка на 7–14-й день жизни, наносят на специальные фильтровальные бумажные бланки типа TFN и высушивают при комнатной температуре в горизонтальном положении на чистой поверхности не менее 2 ч без применения дополнительной тепловой обработки и попадания прямых солнечных лучей, годность сухих пятен крови на фильтровальной бумаге составляет один год (в соответствии с инструкцией производителя).

Выделение ДНК из сухих пятен крови

В пробирку объемом 1,5–2,0 мл из сухого пятна крови на фильтровальной бумаге выбивают 3 диска при помощи ручного дырокола. После каждого образца ножку пробойника дырокола протирают 70° спиртом, высушивают для исключения контаминации. Добавляют 450 мкл ДВ-буфера, вортексируют в течение 15 с, инкубируют в термошейкере при 50–55 °С в течение 1–2 ч или при 37 °С — 12 ч. Затем осаждают при 3000 об/мин в течении 5 с. Большим наконечником отбирают верхнюю фазу, которую переносят в новую пробирку. Далее высаливают ДНК, для этого к лизату добавляют 8М ацетат аммония в объеме, равном объему лизата. Смесь тщательно перемешивают на вортексе и охлаждают в морозильной камере в течение 10 мин. Центрифугируют при максимальных 10–20 об/мин с охлаждением. Отбирают верхнюю фазу и переносят в новую пробирку. Далее производят преципитацию и отмывку ДНК равным объемом изопропанола. Центрифугируют на 14 000 оборотов в течение 20 мин с охлаждением. Отбирают супернатант типсом или вакуумным аспиратором. К осадку добавляют 70° спирт в объеме 500 мкл, центрифугируют 14 000 оборотов в течение 10 мин. Затем спирт аккуратно отбирают, а осадок высушивается до полного испарения остатков спирта.

Растворение и измерение концентрации ДНК

Стандартное растворение осуществляют в 20–50 мкл ТЭ-буфера (рН = 7,4–8,0). ДНК растворяют в термомиксере при 25–40 °С в течение 1 ч. После инкубации раствор ДНК тщательно перемешивают на вортексе, осаждают капли центрифугированием 5–10 с. Измерение выполняют на спектрофотометре. Чистая ДНК имеет значение A260/A280 в диапазоне 1,7–2,0, а A260/A230 — 2,0–2,3. Раствор ДНК должен иметь минимальную пороговую концентрацию не менее 10 нг/мкл. В случае соответствия нормам данный материал принимают к исследованию.

Стандарты для ПЦР-РВ

Стандарты представляют собой рекомбинантную плазмиду pCR2.1-ТОРО с клонированными в нее последовательностями ALB–TREC–KREC.

Для построения калибровочной кривой используют разведения с шагом в 10 раз плазмидной ДНК, переведенной в линейную форму, содержащей соответствующие вставки ALB, TREC, KREC, концентрация которых составляет 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 копий в 5 мкл.

Определение количества копий TREC и KREC методом мультиплексной ПЦР-РВ

Мультиплексную ПЦР-РВ выполняют с исследуемым образцом ДНК и тремя парами праймеров, меченных тремя разными флуоресцентными метками: олигонуклеотиды для контрольного гена альбумина с флуоресцентной меткой FAM, для TREC с меткой HEX, для KREC с Cy5.

Для ПЦР готовят раствор, который включает смесь оригинальных праймеров и зондов с исходной концентрацией 100 пмоль/мкл каждый, смешанных в одной пробирке.

Смесь праймеров хранят при $-20\text{ }^\circ\text{C}$, избегая многократного размораживания и замораживания. Праймеры и плазмидные стандарты размораживают при температуре от 20 до $-25\text{ }^\circ\text{C}$ непосредственно перед постановкой ПЦР. Для количественной оценки кольцевых структур TREC/KREC и контрольного гена ALB используют серийные разведения линеаризированной плазмидной ДНК, содержащей вставки альбумин, TREC, KREC соответственно с концентрацией 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 копий в 5 мкл.

Реакционная смесь для ПЦР состоит из: двукратного мастер микса — 12,5 мкл, данный реагент не должен содержать референсных красителей, т. к. они могут перекрываться с используемыми метками по флуоресценции; воды — 6,25 мкл и раствора смеси праймеров — 1,25 мкл (ALB: по 1,5 мкл прямого и обратного праймеров и 1 мкл флуоресцентной пробы FAM, TREC по 3 мкл прямого и обратного праймеров и 2 мкл флуоресцентной пробы HEX, KREC по 3 мкл прямого и обратного праймера и 2 мкл флуоресцентной пробы Cy5). Все образцы вносят в лунки 96-луночной плашки или стрипов в дубликатах.

Вносят реакцию смесь — 20 мкл, затем ДНК — 5 мкл, деионизованную воду — 5 мкл в лунки с отрицательными контролями, в последнюю очередь стандарты — 5 мкл.

Далее плашку закрывают оптическими крышками либо пленкой, осаждают капли со стенок плашки центрифугированием 1200 об/мин — 1 мин. Загружают плашку в ПЦР-блок. Программируют амплификатор с системой детекции в режиме реального времени для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала:

95 °C — 10 мин

95 °C — 15 с

60 °C — 1 мин



50 циклов

Детекция флуоресцентного сигнала производится по каналам для флуорофоров FAM/Green, HEX/Yellow и Cy5/Red для трех проб в одной лунке соответственно.

После завершения ПЦР-реакции анализируют полученные результаты.

Анализ результатов

Величину Threshold устанавливают вручную на уровне 30 % для каналов (FAM, HEX, Cy5) от максимального уровня флуоресценции.

Принцип анализа результатов амплификации следующий: анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам.

В начале анализируют показатели контрольного гена альбумина. Для этого выбирают канал флуоресценции FAM. Значение стандартного отклонения (StD) для порогового цикла для каждой анализируемой пробы не должно превышать 0,5 в повторях (это правило действительно и для всех остальных мишеней). Образец считают положительным, если Ct для контрольного гена находится в диапазоне 18,0–28,0 циклов. При этом количество копий контрольного гена альбумина должно быть не менее 1000.

Если значение Ct не укладывается в диапазон 18,0–28,0 циклов — образец считают отрицательным.

Далее анализируют TREC и KREC, выбирают канал флуоресценции HEX и Cy5 соответственно. Данные так же анализируют по пересечению кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией. Положительным считают образец со значением Ct ниже значения интерсепт (39–40 цикла).

После завершения ПЦР прибор автоматически строит стандартную кривую. Каждая калибровка количественно характеризуется тремя параметрами: углом наклона (slope) — для десятичной логарифмической шкалы SQ должен составлять 3,3; коэффициентом корреляции (R) — значение должно быть не ниже 0,98, а эффективность реакции в пределах (95–105 %); значением (intersept) — выражается показателем Ct, которое условно является порогом теоретической чувствительности метода.

Результаты реакции считают достоверными, если в лунках с отрицательным контролем сигнал флуоресценции отсутствует (детектируемое значение Ct) по всем трем каналам либо проходит на уровне значения интерсепт +1 (≥ 40 циклам).

В случае, когда все критерии ПЦР-РВ выполнены, рассчитывают количество копий TREC и KREC.

С учетом гена внутреннего контроля ALB производят пересчет количества копий TREC и KREC. Количество копий на 1 млн клеток рассчитывают исходя из того, что в каждой клетке присутствуют две копии контрольного гена, а количество молекул TREC/KREC не может быть более 1. Количество копий TREC и KREC рассчитывают на 1 млн ядросодержащих лейкоцитов по формуле:

$$\text{количество TREC (KREC)} = (\text{количество копий TREC (KREC)} \\ \text{на мл/количество копий ALB}) \times 1\,000\,000$$

В результате произведенных расчетов получают количество копий TREC и KREC на 1 млн ядросодержащих клеток крови.

Принятие решений о наличии/отсутствии отдельных нарушений, вовлекающих иммунный механизм

Далее полученные значения сравнивают с диапазоном нормальных значений для здоровых доношенных новорожденных.

Диапазон нормальных значений молекул TREC и KREC у доношенных новорожденных:

	TREC	KREC
На 10^6 клеток	$3,38 \times 10^3 - 2,38 \times 10^5$	$2,73 \times 10^3 - 2,37 \times 10^5$

Недоношенные новорожденные в связи с незрелостью иммунной системы могут иметь более низкие показатели TREC и KREC в периферической крови, что не является признаком заболевания. Нижняя диагностическая граница может быть понижена до $1000 \text{ копий} \times 10^6$ клеток периферической крови для TREC и до $500 \text{ копий} \times 10^6$ клеток копий — для KREC.

Так как в изложенной методике используется мультиплексное (одновременное исследование TREC и KREC), оптимальным сроком выполнения данного исследования определяется маркером TREC, для которого свойственно более позднее появление в системе кровообращения новорожденного. Необходимо учитывать срок гестации недоношенного ребенка. Согласно проведенного исследования среди недоношенных новорожденных сроком гестации менее 35 недель и получению низких показателей количества копий TREC (менее 1000×10^6 лейкоцитов) и KREC (менее 500×10^6 лейкоцитов) при нормальном количестве контрольного гена (>1000 копий), данное исследование необходимо повторить по достижению новорожденным срока гестации не менее 37 недель для получения наиболее информативных данных о состоянии иммунной системы ребенка. Новорожденным, у которых будет обнаружено низкое/отрицательное количество TREC и /KREC, при нормальном количестве копий контрольного гена необходимо провести иммунологическое исследование клеточного и гуморального иммунитета с определением субпопуляций Т- и /В-лимфоцитов.

Имунофенотипирование лимфоцитов выполняют с использованием моноклональных антител к поверхностным дифференцировочным антигенам на клетках иммунной системы методом проточной лазерной цитофлуориметрии на проточных цитофлуориметрах. Необходимо провести определение основных популяций (Т-клетки, В-клетки, натуральные киллеры) и субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-хелперы, Т-цитотоксические лимфоциты). Для первичного исследования иммунного статуса и выявления выраженных нарушений иммунной системы ВОЗ рекомендовано определение CD3, CD4, CD8, CD19, CD16+56, соотношение CD4/CD8. Исследование позволяет определить относительное и абсолютное количество основных популяций лимфоцитов: Т-клетки — CD3, В-клетки — CD19, натуральные киллеры (NK) — CD3- CD16++56+, субпопуляции Т-лимфоцитов (Т-хелперы CD3+ CD4+, Т-цитотоксические CD3+ CD8+ и их

соотношение). При выявлении изменений в показателях клеточного и гуморального иммунитета показана консультация врача-иммунолога.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнения	Причины/следствие	Пути устранения
Количество копий контрольного гена ALB <1000 копий	Недостаточное количество ДНК (<10 нг/мкл)	При хорошем качестве ДНК повторить реакцию, при низком – перевыделить ДНК и повторить ПЦР реакцию
Ни в одной лунке не наблюдаются амплификации при наличии амплификации от калибраторов	Недостаточное количество ДНК. Неправильное выделение ДНК из исследуемого материала, и, как следствие, загрязнение ДНК ингибиторами ПЦР	Измерить количество, оценить качество ДНК, если материал соответствует всем параметрам — повторить эксперимент. Если материал не соответствует требованиям — перевыделить ДНК