

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Л.Богдан

« 21 » 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

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 в реальном времени, 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 специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с отдельными нарушениями, вовлекающими иммунные механизмы, в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) условиях отделения дневного пребывания.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

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

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Нет.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

PB - ПЦР – полимеразная цепная реакция в «режиме реального времени»;

Трис – химическое соединение трис (гидроксиметил) аминметан $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$;

ALB – альбумин;

DB – лизирующий буфер (от англ. digestion buffer);

TREC – эксцизионное кольцо T-клеточного рецептора (от англ. T-cell receptor excision circles);

KREC – эксцизионное кольцо рекомбинации каппа цепи (от англ. kappa-deleting recombination excision circles);

ТЭ-буфер – буферный раствор (состоит из Трис и ЭДТА).

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 000 об/мин;
морозильная камера;
спектрофотометр;
дырокол;
термомиксер;
вортекс;
компьютер с программным обеспечением для управления прибором ПЦР в режиме «реального времени», хранения данных и анализа;
дозаторы переменного объема (от 0,1 до 10 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл);
одноразовые наконечники с фильтром до 10, 100, 200, 1000 мкл;
одноразовые пробирки от 0,2 мкл-1,5 мл;
одноразовая пластиковая посуда для постановки ПЦР в режиме «реального времени», микропробирки, стрипы, 96-луночные плашки (посуда должна подходить к прибору, на котором выполняют постановку РВ-ПЦР).

Реактивы

Вода деионизованная;
изопропанол;
ацетат аммония 8М;
лизирующий буфер (DB);
флуоресцентно-меченные праймеры для амплификации генов альбумина TREC, KREC;
2-х кратный мастер микс для проведения ПЦР в «реальном времени» с флуоресцентной пробой;
буфер ТЭ.

ТЕХНОЛОГИЯ ПРИМЕНЕНИЯ 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.

1 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-й - 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-х часов без применения дополнительной тепловой обработки и попадания прямых солнечных лучей, годность «сухих пятен крови» на фильтровальной бумаге составляет год/в соответствии с инструкцией производителя.

1.1 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 DB-буфера, вортиксируют в течение 15 секунд, инкубируют в термощейкере при 50-55°C в течение 1 - 2 часов или при 37°C – 12 часов. Затем осаждают при 3 000 об/мин 5 секунд. 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 минут. Центрифугируют при максимальных оборотах 10 - 20 минут с охлаждением. Отбирают верхнюю фазу и переносят в новую

пробирку. Далее проводят преципитацию и отмывку ДНК равным объемом изопропанола. Центрифугируют на 14 000 оборотов 20 минут с охлаждением. Отбирают супернатант типсом или вакуумным аспиратором. К осадку добавляют 70°С спирт в объеме 500 мкл, центрифугируют 14 000 оборотов 10 минут. Затем спирт аккуратно отбирают, а осадок высушивается до полного испарения остатков спирта.

1.2 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 секунд. Измерение выполняют на спектрофотометре. Чистая ДНК имеет значение A_{260}/A_{280} в диапазоне 1,7 - 2,0 и A_{260}/A_{230} в диапазоне 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.

2 Стандарты для ПЦР в «реальном времени»

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.

3 Определение количества копий TREC и KREC методом мультиплексной ПЦР в «реальном времени»

Мультиплексную ПЦР-РВ выполняют с исследуемым образцом ДНК и тремя парами праймеров, меченных 3-я разными флуоресцентными метками: олигонуклеотиды для контрольного гена альбумина с флуоресцентной меткой FAM, для TREC с меткой HEX, для KREC с Cy5.

Для проведения 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°C , избегая многократного размораживания и замораживания. Праймеры и плазмидные стандарты размораживают при температуре $+20 - 25^{\circ}\text{C}$ непосредственно перед постановкой ПЦР. Для количественной оценки кольцевых структур TREC/KREC и контрольного гена ALB используют серийные разведения линейризованной 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: 2-х кратного 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 реакционную смесь – 20 мкл, затем ДНК – 5 мкл, деионизированную воду объеме 5 мкл в лунки с отрицательными контролями в, в последнюю очередь стандарты – 5 мкл.

Далее плашку закрывают оптическими крышками либо пленкой, осаждают капли со стенок плашки центрифугированием 1 200 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:

$95^{\circ}\text{C} - 10 \text{ мин}$

$95^{\circ}\text{C} - 15 \text{ сек}$



50 циклов

60°C – 1 мин

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

После завершения ПЦР-реакции проводят анализ полученных результатов.

4 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 повторах (это правило действительно и для всех остальных мишеней). Образец считают положительным, если St для контрольного гена находится в диапазоне 18,0 - 28,0 циклов. При этом количество копий контрольного гена альбумина должно быть не менее 1 000.

Если значение St 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 St 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 цикла).

В случае, когда все критерии ПЦР «в режиме реального времени» выполнены, рассчитывают количество копий TREC и KREC.

С учетом гена внутреннего контроля ALB проводят пересчет количества копий TREC и KREC. Количество копий на 1 млн клеток рассчитывают исходя из того, что в каждой клетке присутствует 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:

$$\text{Количество TREC (KREC)} = (\text{количество копий TREC (KREC)} \text{ на мл/количество копий ALB}) \times 1000000.$$

В результате проведенных расчётов, получают количество копий TREC и KREC на 1 млн ядросодержащих клеток крови.

5 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 1 000 копий $\times 10^6$ клеток периферической крови для TREC и до 500 копий $\times 10^6$ клеток копий – для KREC.

Т.к. в изложенной методике используется мультиплексное (одновременное исследование TREC и KREC) оптимальный сроком выполнения данного исследования определяется маркером TREC, для которого свойственно более позднее появление в системе кровообращения новорожденного. Необходимо учитывать срок гестации недоношенного ребенка. При проведении исследования у недоношенных новорожденных сроком гестации менее 35 недель и получении низких показателей количества копий TREC (менее 1 000 $\times 10^6$ лейкоцитов) и /KREC (менее 500 $\times 10^6$ лейкоцитов) при нормальном количестве контрольного гена (>1 000 копий) необходимо повторить исследование 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 проводят 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 для постановки диагноза, связанного с нарушениями, вовлекающими иммунный механизм.

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

Осложнения	Причины/ Следствие	Пути устранения
Количество копий контрольного гена ALB < 1 000 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 наблюдают 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