

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления гена RHD плода в крови матери
методом ПЦР в режиме реального времени

Резус-фактор плода

Фасовка стандартная (S)

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2017/5310 от 30 января 2017 года

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 НАЗНАЧЕНИЕ.....	7
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.....	7
2.1 Состав набора реагентов.....	7
2.2 Количество анализируемых проб.....	7
2.3 Принцип метода.....	8
2.4 Время проведения анализа.....	9
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	10
3.1 Специфичность анализа.....	10
3.2 Чувствительность анализа.....	10
3.3 Диагностические характеристики.....	10
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	11
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	12
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	13
6.1 Материалы для исследования.....	13
6.2 Транспортировка и хранение исследуемого материала.....	13
6.3 Получение плазмы крови.....	13
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	14
7.1 Выделение ДНК из биологического материала.....	14
7.2 Подготовка и проведение ПЦР.....	14
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ.....	16
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР.....	17
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	21
10.1 Транспортирование.....	21
10.2 Хранение.....	21
10.3 Указания по эксплуатации.....	22
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	22
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	22
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ.....	23
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА.....	23
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	23
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ.....	24
Приложение 1.....	25
Приложение 2.....	26

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
КВМ	- контроль взятия материала
К+	- положительный контрольный образец
К-	- отрицательный контрольный образец

ВВЕДЕНИЕ

В акушерско-гинекологической практике часто возникает необходимость определения генотипа плода на ранних сроках беременности. До недавнего времени материал для таких исследований получали инвазивно при хорион-, плацентобиопсии и в ходе амнио- и кордоцентеза. Риск самопроизвольного прерывания беременности в этом случае составляет 2-3 %. Открытие наличия фетальных ДНК (фетДНК) и РНК в материнской крови послужило основой для развития неинвазивной пренатальной диагностики, которая в отличие от прежних методов, не представляет угрозы течению беременности, т.к. материалом для исследования служит кровь матери. Фетальная ДНК, т.е. ДНК плода, обнаруживается в крови беременной женщины, её количество возрастает с увеличением срока гестации, зависит от состояния плаценты и особенностей течения беременности.

Начиная с 8-10 недель беременности, методы неинвазивной пренатальной молекулярно-генетической диагностики позволяют проводить исследование фетальной ДНК с точностью 96-100 % для прогнозирования развития резус-конфликта и гемолитической болезни плода.

Научное обоснование

В системе резус различают пять антигенов. Наиболее иммуногенным является антиген D, присутствие которого на поверхности эритроцитов определяет положительный резус-фактор (Rh+). Распространенность резус-положительных лиц, носителей антигена D, в популяции составляет около 86 %, соответственно, доля резус-отрицательных лиц (Rh-), не имеющих антигена D - около 14 %.

Течение беременности резус-положительным (Rh+) плодом у резус-отрицательных (Rh-) женщин часто осложняется развитием гемолитической болезни плода, связанной с трансплацентарным переносом эритроцитов плода в кровотоки матери. 98% случаев гемолитической болезни новорожденных связаны с D-резус-антигеном. Попадая в кровь (Rh-) матери, он вызывает образование специфических антител, которые проникают через плаценту, разрушают эритроциты плода, что влечёт за собой развитие гемолитической болезни новорожденных. При раннем проявлении резус-конфликт может быть причиной преждевременных родов или выкидышей. Сенсибилизация матери к D-антигену и риск развития резус-конфликта возрастают с каждой последующей беременностью (Rh+) плодом, независимо от того прервалась беременность или прошло родоразрешение.

Определение резус-фактора методом ПЦР в режиме реального времени заключается в выявлении гена RHD, кодирующего D-антиген. Традиционным серологическим методом исследуется наличие непосредственно D-антигена на эритроцитах крови. Чаще всего отрицательный резус-фактор обусловлен полным отсутствием гена RHD. В этом случае резус-фактор определяется как отрицательный серологическим методом и методом ПЦР, т.е. результаты исследований совпадают.

У 1% серологически резус-отрицательных лиц определяется наличие гена RHD. Это происходит в случаях отсутствия или снижения экспрессии гена RHD. Такие пациентки являются генотипически резус-положительными, и определить резус-фактор плода методом ПЦР невозможно. Однако наблюдение за течением беременности необходимо проводить по схеме ведения резус-отрицательных пациенток с возможностью развития резус-конфликта.

Набор реагентов для выявления гена RHD плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени может использоваться в рамках пренатального скрининга осложнений течения беременности у резус-отрицательных женщин.

Показания к проведению исследования:

- Ведение беременности у женщины с отрицательным резус-фактором для своевременного расчета риска развития резус-конфликта;
- Отсутствие в крови беременной женщины с отрицательным резус-фактором антител к D-антигену плода перед профилактическим введением иммуноглобулина;
- Хирургическое прерывание беременности у женщины с отрицательным резус-фактором, с целью прогнозирования развития резус-конфликта при последующих беременностях.

Исследование не рекомендовано в случае трансплантации костного мозга в анамнезе у матери, так как возможно получение некорректных результатов.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1 Настоящая инструкция распространяется на набор реагентов для выявления гена RHD плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени (Резус-фактор плода).
- 1.2 Набор реагентов Резус-фактор плода предназначен для обнаружения гена RHD плода в крови беременной женщины с отрицательным резус-фактором методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с целью прогнозирования риска развития резус-конфликта и гемолитической болезни плода и новорожденного.
- 1.3 Полученные результаты могут использоваться в рамках пренатального скрининга осложнений течения беременностей у резус-отрицательных женщин.
- 1.4 Функциональное назначение: набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (обнаружения гена RHD плода в крови беременной женщины с отрицательным резус-фактором).
- 1.5 Набор может быть использован в клинично-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.
- 1.6 Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории.
- 1.7 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Состав набора реагентов

Набор реагентов Резус-фактор плода выпускают в стандартной фасовке со смесью для амплификации в стрипах (маркируется - фасовка S, стрипы) или со смесью для амплификации в пробирках (маркируется – фасовка S, пробирки).

2.2 Количество анализируемых проб

Набор реагентов рассчитан на проведение 96 определений, что соответствует исследованию 46 неизвестных образцов (в двух повторах каждый), отрицательного контрольного образца (в трёх повторах) и положительного контрольного образца.

REF R1-H802-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл в пробирке
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	75 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

REF R1-H802-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок	по 20 мкл в пробирке
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	75 мкл

2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный мультиплексный анализ.

В основе работы наборов реагентов лежит принцип амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров комплементарных специфическому участку ДНК и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров Таq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в реакционную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

Набор реагентов Резус-фактор плода включает: смесь для амплификации, специфичную для определения двух экзонов гена RHD (7 и 10) и геномной ДНК человека (КВМ). Определение гена RHD по двум экзонам охватывает большую гетерогенную группу вариантов этого гена. КВМ используется для анализа качества выделения и позволяет определить, достаточно ли полученного количества ДНК для исследования. Расчёт результатов исследования основан на сравнении индикаторных циклов исследуемых мишеней (ΔC_p).

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (a , следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продуктов амплификации фрагментов 7 и 10 экзонов гена RHD, включены флуоресцентные метки Fam и Rox соответственно. В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продуктов амплификации КВМ, входит флуоресцентный краситель Hex.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке. В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации и ДНК-мишени, определяемые набором.

Таблица 1 – Перечень ДНК-мишеней, определяемых набором, и каналов детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Ген RHD, 7 экзон	КВМ	Ген RHD, 10 экзон	-	-

Исследование с использованием набора реагентов состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК-ФЕТ и ПЦР-амплификация в режиме реального времени с использованием набора реагентов Резус-фактор плода.

Для проведения ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени используют детектирующие амплификаторы (ООО «НПО ДНК-Технология») «ДТпрайм», «ДТлайт» и «ДТ-96» со специальным программным обеспечением.

2.4 Время проведения анализа (без учета пробоподготовки): от 2 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1 Специфичность анализа

В результате амплификации ДНК, выделенной из крови генотипически резус-отрицательной беременной женщины и не содержащей ген RHD, должны регистрироваться отрицательные результаты по каналам Fam и Rox, но положительный по каналу Hex.

В результате амплификации ДНК, содержащей ген RHD с наличием 7 экзона, должны регистрироваться положительные результаты по каналам Fam и Hex, с наличием 10 экзона - по каналам Rox и Hex. Наличие двух или одного любого экзона гена RHD в образце фетальной ДНК определяет генотипически положительный резус-фактор плода. Интерпретация результатов анализа проводится автоматически с помощью программного обеспечения к прибору (см. приложение).

3.2 Чувствительность анализа

Чувствительность набора при использовании комплекта реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери ПРОБА-НК-ФЕТ составляет 150 копий геномной ДНК (суммарной ДНК матери и плода) в 1,0 мл исследуемого образца плазмы крови.

Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 0,1 нг на амплификационную пробирку, что соответствует $C_p \leq 35,0$ на канале детекции КВМ (Hex). При использовании меньшего количества ДНК ($C_p > 35,0$ на канале детекции КВМ) могут быть получены недостоверные результаты, связанные с недостаточным для проведения анализа количеством фетальной ДНК.

3.3 Диагностические характеристики

Диагностическая чувствительность 100 % (92-100) %.

Диагностическая специфичность 100% (90-100) %.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические ПЦР исследования клинического материала с соблюдением 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 с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории.

При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СП 1.3.2322-08 и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только новые наконечники и пробирки.

Подготовку и проведение исследования с использованием набора реагентов следует проводить в ПЦР-боксах.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение одного часа.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечению срока годности набора.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- бокс биологической безопасности II класса;
- амплификатор детектирующий («ДТпрайм»¹, «ДТлайт»² или «ДТ-96» производства ООО «НПО ДНК-Технология»);
- микроцентрифуга-вортекс, например, BioSan, Латвия или аналогичная;
- холодильник бытовой Стинол, Россия или аналогичный;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия или аналогичные;
- дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 2 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл, например, Eppendorf, Германия или аналогичные;
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл, например, Ахуген, США или аналогичные;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

Для взятия и предобработки материала для исследования и выделения ДНК:

- комплект реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери (ПРОБА-НК-ФЕТ производства ООО «ДНК-Технология ТС»);
- центрифуга для пробирок объёмом 4,5 мл, с RCF не ниже 1150 g, например, центрифуга EBA 20 Hettich (3461 x g или 6000 об/мин);
- центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF не ниже 17000 x g, например, центрифуга HERAEUS pico17 (17000 g или 13300 об/мин);
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 65 °С до 98 °С;
- вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette с ЭДТА.

Программное обеспечение для детектирующих амплификаторов:

- версия ПО не ниже 7.7.5.23³;
- файл с параметрами анализа «RHD.ini».

¹ - только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6

² - только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2

³ - производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <https://www.dna-technology.ru/poequip/po-dlya-oborudovaniya>

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материалы для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

Взятие цельной периферической крови

Необходимый объем крови составляет 4,0-4,5 мл. Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объёмом 4,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2–3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.2 Транспортировка и хранение исследуемого материала

Рекомендуется начать обработку крови в первые два часа после её взятия.

В случае невозможности проведения обработки крови в течение 2 часов допускается её хранение при температуре от 18 °С до 25 °С не более 4-8 часов.

6.3 Получение плазмы крови

6.3.1 Центрифугируйте пробирки с кровью при 1000 - 2000 x g в течение 20 мин при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

ВНИМАНИЕ! Относительное ускорение центрифуги (RCF или g) зависит от частоты вращения и радиуса центрифугирования (Приложение А). Для определения соответствия центрифуги заданным параметрам центрифугирования обратитесь к руководству по эксплуатации.

6.3.2 Промаркируйте необходимое количество пробирок объёмом 1,5 мл (по две для каждого исследуемого образца).

6.3.3 Не задевая нижнюю (клеточную) фракцию, отберите автоматическим дозатором по 900 мкл верхней фракции (плазма) и перенесите в две промаркированные пробирки.

ВНИМАНИЕ! Для выделения ДНК используется только одна пробирка! Вторая пробирка может быть заморожена при минус 20 °С или ниже, при необходимости, использована для повторного выделения ДНК.

До начала выделения пробирки с плазмой могут храниться при температуре от 4 °С до 8 °С в течение 8 часов.

При планировании выделения фетДНК на следующий день или позже, пробирки с плазмой необходимо заморозить при минус 20 °С или ниже. Замороженная плазма может храниться не более 3 месяцев. Перед началом выделения по одной пробирке каждого образца необходимо разморозить при комнатной температуре.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплексу реагентов ПРОБА-НК-ФЕТ, производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия.

ВНИМАНИЕ! При использовании наборов для выделения фетДНК других производителей могут быть получены некорректные результаты.

Одновременно с выделением ДНК из периферической крови необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец, входящий в состав комплекта реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери (ПРОБА-НК-ФЕТ), в объеме согласно инструкции к набору реагентов для выделения ДНК.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР

ВНИМАНИЕ! Так как фетальная ДНК находится в крови беременной женщины в минимальном количестве, анализ каждого образца ДНК рекомендуется проводить в дублях.

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.2.1 Промаркируйте по две пробирки стрипов (или по две отдельные пробирки) со смесями для амплификации для каждого исследуемого образца, одну для положительного контрольного образца (К+), и три для отрицательного контрольного образца (К-).

Например: Необходимо проанализировать два образца. Нужно промаркировать восемь пробирок – четыре для исследуемых образцов, одну для К+ и три для К- (см. таблицу 2).

Таблица 2 – Пример маркировки пробирок для проведения ПЦР

Образец 1	Пробирки 1 - 2
Образец 2	Пробирки 3 - 4
К+	Пробирка 5
К-	Пробирки 6 - 8

7.2.2 Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы в течение 3-5 сек и центрифугируйте в течение 1-3 сек на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Внесите в промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы.

7.2.4 Внесите в промаркированные пробирки по одной капле (приблизительно 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки стрипов или пробирок.

7.2.5 Встряхните пробирки с полученными препаратами ДНК и контрольными образцами в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге-вортексе.

- 7.2.6 Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа (или только той пробирки), в который будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.
- Внесите, не повреждая слой парафина по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (2 шт. для каждого образца). В пробирки маркированные К+ и К- ДНК не вносятся.
- 7.2.7 Внесите, не повреждая слой парафина 5,0 мкл положительного контрольного образца в пробирку, маркированную К+. Внесите, не повреждая слой парафина по 5 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК в пробирки, маркированные К- (всего 3 шт.).
- 7.2.8 Закройте крышки стрипов (пробирок). Центрифугируйте стрипы (пробирки) в течение 1-3 сек на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.9 Установите все стрипы (пробирки) в блок детектирующего амплификатора.
- 7.2.10 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR, в режиме «Работа с прибором», загрузите файл "RHD.ini", добавьте в протокол тест «RHD», укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. п. 7.2.8) и проведите ПЦР. При выборе теста «RHD» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов необходимо уточнить программу амплификации у представителя компании «ДНК-Технология».

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» и «ДТ-96»

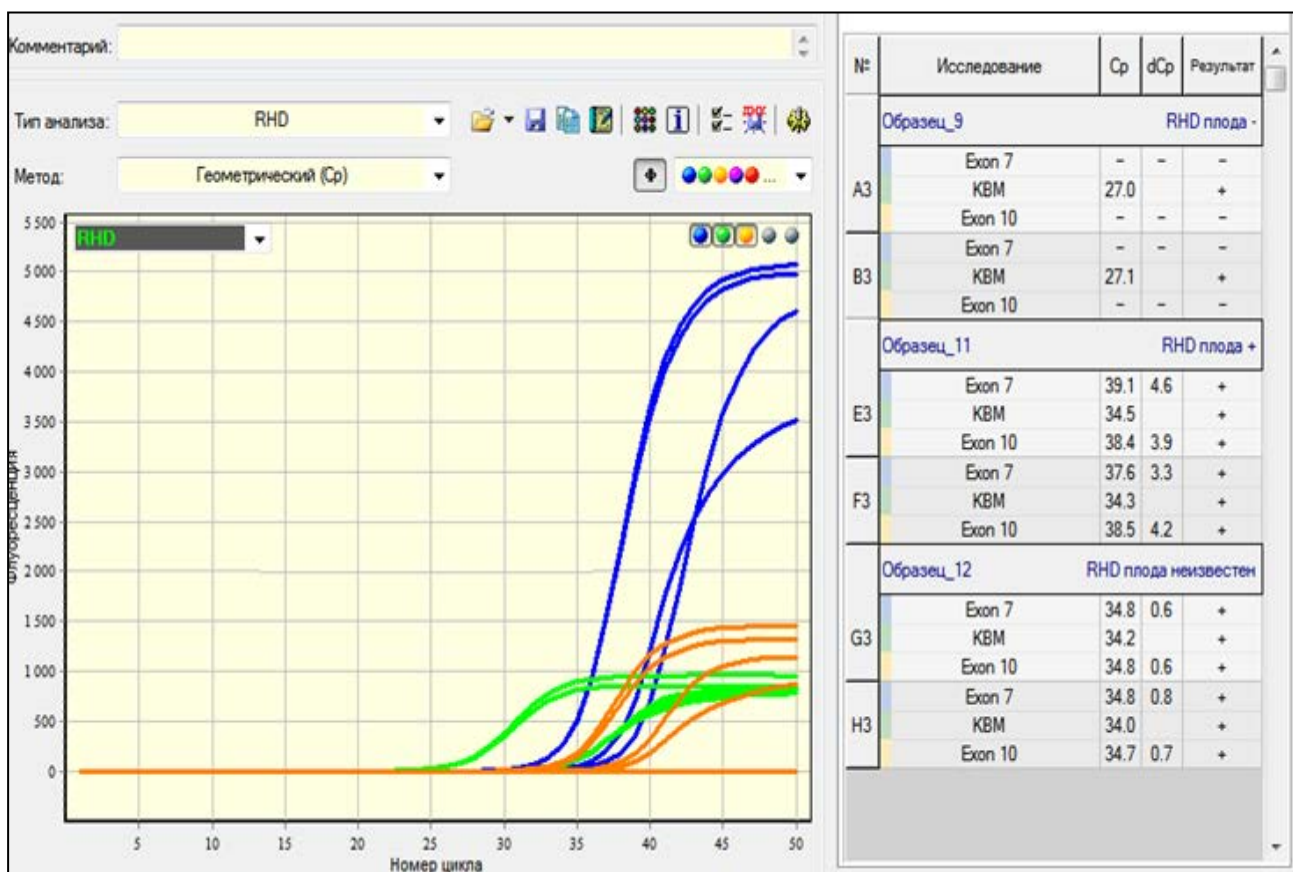
№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	10	хранение		хранение

Тесты (ini файлы) для приборов «ДТпрайм», «ДТлайт» и «ДТ-96» предоставляются производителем набора реагентов.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

- 8.1 Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.
- 8.2 Детекция и учёт результатов осуществляются детектирующим амплификатором автоматически.
- 8.3 После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов. Анализ проводится автоматически программным обеспечением.
- 8.4 На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла по всем используемым каналам для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторные циклы по трем каналам (Cp), ΔCp (dCp) и результат исследования по дублям.

Пример выдачи результатов прибором:



По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР

- 9.1 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.
- 9.2 Результат исследования для каждого образца определяется программным обеспечением автоматически с учётом значений C_p КВМ (канал Нех) и ΔC_p по каналам спецификации (каналы Fam и Rox) в совокупности по дублям для этого образца (см. приложение).
- 9.3 В образцах, прошедших ПЦР и содержащих достаточное количество ДНК, для которых получены корректные значения ΔC_p , программа определяет генотип исследуемого образца, который отображён в таблице в графе «Результат». В этом случае выдается заключение по результатам исследования.

Ниже представлены варианты результатов исследования и бланки ответа⁴:

Образец 27, результат исследования RHD плода –

Образец_27		RHD плода -		
E7	Exon 7	-	-	-
	KBM	34.5		+
	Exon 10	-	-	-
F7	Exon 7	-	-	-
	KBM	34.2		+
	Exon 10	-	-	-

Бланк ответа:

Пренатальная диагностика.

Резус – фактор.

Дата
 Номер пробирки
 Ф.И.О. пациента
 Пол
 Возраст
 Организация
 Врач
 Примечание

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: Образец_27

Название исследования	Результат	Интерпретация результата
Выявление гена резус – фактора (RHD) плода	Не выявлен	Резус-фактор плода: генотипически отрицательный.

Внимание: Данное исследование проводится только у серологически резус-отрицательной пациентки при сроке беременности более 8 недель.

Заключение:
 Развитие резус-конфликта маловероятно.

Точность результата зависит от количества ДНК плода, обнаруживаемой в материнской плазме. Данная величина обусловлена состоянием плаценты и возрастает с увеличением срока беременности. Определение резус-фактора методом ПЦР в режиме реального времени заключается в обнаружении гена RHD плода, кодирующего D-антиген, в крови матери. Традиционный серологический метод основан на выявлении непосредственно D-антигена на эритроцитах крови. Чаще всего отрицательный резус-фактор обусловлен полным отсутствием гена RHD и, как следствие, отсутствием D-антигена. В этом случае серологическим методом и методом ПЦР резус-фактор определяется как отрицательный, т.е. результаты исследований совпадают. Согласно литературным данным, в редчайших случаях (менее 0,1%) встречается такой вариант гена RHD, когда резус-фактор плода генотипически определяется как отрицательный, а после рождения ребенка серологически может выявляться как слабоположительный. В этом случае в период беременности возможно развитие резус-конфликта слабой выраженности.

Исследование выполнил: _____ Дата: _____
 Подпись: _____

⁴ - для срока беременности более 8 эмбриологических или 10 акушерских недель

Образец 22, результат исследования RHD плода +

Образец_22		RHD плода +		
С6	Exon 7	35.8	2.5	+
	KBM	33.3		+
	Exon 10	35.8	2.5	+
D6	Exon 7	35.6	2.1	+
	KBM	33.5		+
	Exon 10	35.7	2.2	+

Бланк ответа:

Пренатальная диагностика.

Резус – фактор.

Дата
 Номер пробирки
 Ф.И.О. пациента
 Пол
 Возраст
 Организация
 Врач
 Примечание

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: Образец_22

Название исследования	Результат	Интерпретация результата
Выявление гена резус – фактора (RHD) плода	Выявлен	Резус-фактор плода: генотипически положительный.

Внимание: Данное исследование проводится только у серологически резус-отрицательной пациентки при сроке беременности более 8 недель.

Заключение:
 Возможно развитие резус-конфликта.

Точность результата зависит от количества ДНК плода, обнаруживаемой в материнской плазме. Данная величина обусловлена состоянием плаценты и возрастает с увеличением срока беременности. Определение резус-фактора методом ПЦР в режиме реального времени заключается в обнаружении гена RHD плода, кодирующего D-антиген, в крови матери. Традиционный серологический метод основан на выявлении непосредственно D-антигена на эритроцитах крови.

Согласно литературным данным, в 99% исследований результаты, полученные серологическим методом и методом ПЦР, совпадают. Однако у 1% генотипически резус-положительных лиц серологическим методом может определяться отрицательный резус-фактор, что связано с мутациями в гене RHD и, как следствие, отсутствием или функциональной неполноценностью D-антигена. Поэтому после родов рекомендуется уточнить резус-фактор ребенка серологическим методом.

Исследование выполнил: _____ Дата: _____
 Подпись: _____

Образец 21, результат исследования RHD плода неизвестен – выдаётся, если пациентка генотипически резус-положительная.

Образец_21		RHD плода неизвестен		
A6	Exon 7	29.2	0.6	+
	KBM	28.6		+
	Exon 10	28.7	0.1	+
B6	Exon 7	29.2	0.6	+
	KBM	28.6		+
	Exon 10	28.6	0.0	+

Бланк ответа:

Пренатальная диагностика.

Резус – фактор.

Дата
 Номер пробирки
 Ф.И.О. пациента
 Пол
 Возраст
 Организация
 Врач
 Примечание

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: Образец_21

Название исследования	Результат	Интерпретация результата
Выявление гена резус – фактора (RHD) плода	Выявить невозможно	У матери обнаружен ген RHD. Выявить ген RHD плода данным методом невозможно.

Внимание: Данное исследование проводится только у серологически резус-отрицательной пациентки при сроке беременности более 8 недель.

Заключение:
 Нельзя исключить возможность развития резус-конфликта.

Точность результата зависит от количества ДНК плода, обнаруживаемой в материнской плазме. Данная величина обусловлена состоянием плаценты и возрастает с увеличением срока беременности. Определение резус-фактора методом ПЦР в режиме реального времени заключается в обнаружении гена RHD плода, кодирующего D-антиген, в крови матери. Традиционный серологический метод основан на выявлении непосредственно D-антигена на эритроцитах крови. Чаще всего отрицательный резус-фактор обусловлен полным отсутствием гена RHD и, как следствие, отсутствием D-антигена. В этом случае серологическим методом и методом ПЦР резус-фактор определяется как отрицательный, т.е. результаты исследований разными методами совпадают. Однако, согласно литературным данным, у 1% серологически резус-отрицательных лиц, как в данном случае, присутствует мутированный ген RHD, определяющий генотипически положительный резус-фактор при отсутствии или функциональной неполноценности D-антигена. При наличии такого измененного гена у матери выявить ген RHD плода методом ПЦР невозможно, но при беременности серологически резус-положительным плодом может происходить развитие резус-конфликта.

Исследование выполнил: _____ Дата: _____
 Подпись: _____

- 9.4** Для образцов с недостаточным для анализа количеством ДНК ($Cp > 35,0$ на канале детекции Нех), некорректными значениями ΔCp , или при несовпадении результатов по дублям, программа определяет сомнительные или недостоверные результаты, в графе "Результат" будет указано соответственно "?" или "нд". В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).
- 9.5** Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены результаты, приведенные в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты исследования для отрицательных и положительных контрольных образцов

Внесенный материал	Выбранный флуорофор		
	Fam (RHD, 7 экзон)	Нех (КВМ)	Rox (RHD, 10 экзон)
К- (3 повтора)	Cp не указан ¹ или >41	Cp не указан или >39	Cp не указан или >41
К+	$28 \leq Cp \leq 32$	$28 \leq Cp \leq 32$	$28 \leq Cp \leq 32$

¹Прочерк в таблице результатов.

- 9.6** При получении для отрицательного контрольного образца результатов, отличающихся от значений, указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.
- 9.7** При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от значений, указанных в таблице 4, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора осуществляют в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов, входящих в состав набора.

10.1.2 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

10.2.1 Набор реагентов следует хранить в течение всего срока годности при температуре от $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в холодильных камерах или в холодильниках.

10.2.2 Смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

10.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.3.2 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках;

- смеси для амплификации следует хранить в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

11.2 При использовании набора в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

11.3 Входящие в состав набора реагентов жидкие компоненты, пришедшие в непригодность, перед сливом в канализацию должны быть предварительно разбавлены водой 1:100.

11.4 Упаковка набора реагентов (первичная: пробирки, флаконы и внешняя: пакеты полиэтиленовые с замком и коробки картонные) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

ВНИМАНИЕ! В случае вскрытия упаковки набора в боксе она относится к отходам класса Б и подлежит утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора – 12 месяцев со дня приёмки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Каталожный номер
	Количество тестов		Адрес изготовителя
	Годен до		Не допускается воздействие солнечного света
	Серия набора		Не стерильно
	Дата изготовления		Одноразовое использование

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001:2008 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и EN ISO 13485:2012 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС»;
ООО «ДНК-Технология ТС», Россия.

Адрес производителя: ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, г. Москва,
Научный проезд, д. 20, стр. 4.

Место производства: ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, г. Москва,
Научный проезд, д. 20, стр.4.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов Резус-фактор плода, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ
Чертаново Северное, ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12,
тел./факс +7 (495) 980-45-55, +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки: 8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный),
E-mail: hotline@dna-technology.ru

Приложение 1
(справочное)

Принципы вычисления и интерпретации результатов исследования программным обеспечением

ВНИМАНИЕ! Анализ проводится программным обеспечением автоматически. Изложенные в данном приложении принципы вычисления результатов носят информативный характер и не предназначены для проведения пользователями самостоятельных расчетов.

Расчёт результатов исследования основан на сравнении индикаторных циклов исследуемых мишеней (ΔCp).

Интерпретации результатов исследования

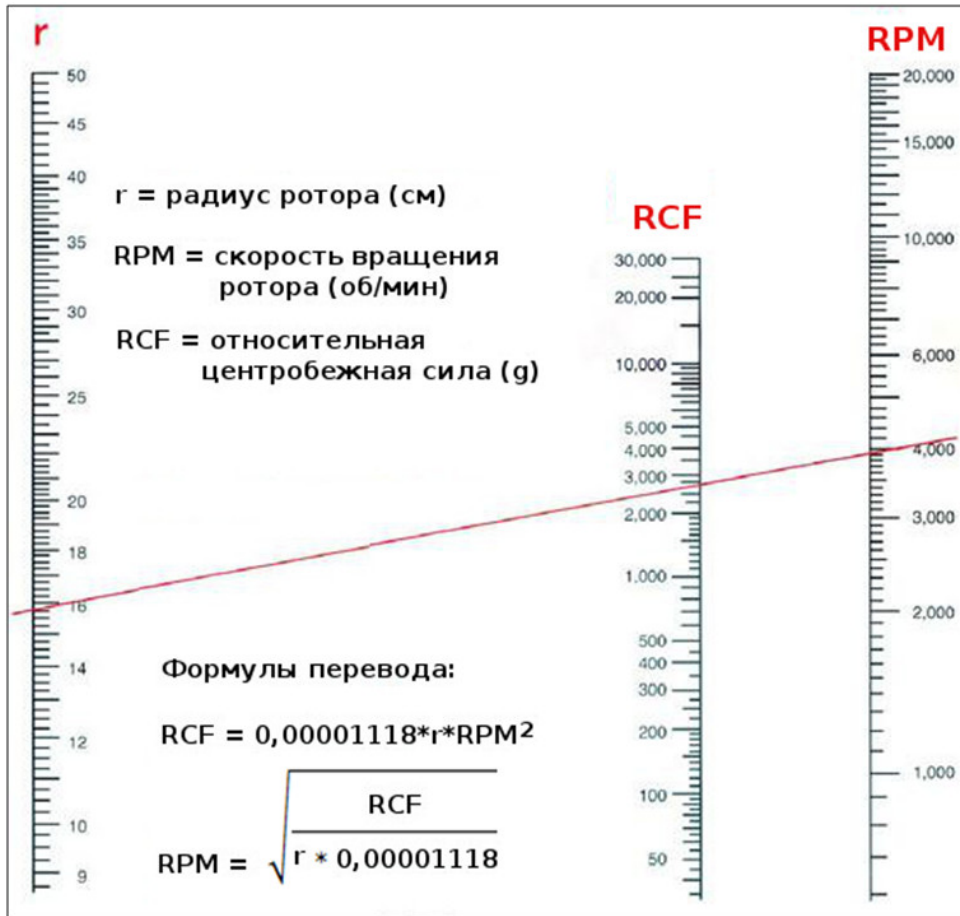
Результат по каналу Fam (Fam Cp)	Результат по каналу Hex (Hex Cp)	Результат по каналу Rox (Rox Cp)	ΔCp (Fam Cp минус- Hex Cp)	ΔCp (Rox Cp минус- Hex Cp)	Интерпретация результата
Cp не указан ¹ или >41,0	Cp ≤ 35	Cp не указан или >41,0	-	-	Резус-фактор плода: генотипически отрицателен
Cp ≤ 41		Cp ≤ 41	Не менее 2,0	Не менее 2,0	Резус-фактор плода: генотипически положителен
Cp не указан или >41,0		Cp ≤ 41	-	Не менее 2,0	
Cp ≤ 41		Cp не указан или >41,0	Не менее 2,0	-	Резус-фактор беременной женщины: генотипически положителен, резус-фактор плода определить данным методом невозможно
Cp ≤ 41		Cp не указан или >41,0	Менее 1,0	-	
Cp не указан или >41,0		Cp ≤ 41	-	Менее 1,0	
Cp ≤ 41		Cp ≤ 41	Cp ≤ 41	Менее 1,0	Менее 1,0

¹Прочерк в таблице результатов.

Примечание – ΔCp может принимать отрицательные значения в случае, если беременная женщина генотипически резус-положительна.

Приложение 2
(справочное)

Номограмма и формула перевода относительного ускорения центрифуги (RCF) в скорость вращения (RPM) в зависимости от диаметра ротора



ООО «ДНК-Технология»
117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное,
ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12
Тел./факс +7 (495) 980-45-55
Служба клиентской поддержки:
8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный)
E-mail: hotline@dna-technology.ru