

ИНСТРУКЦИЯ

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

Резус-фактор плода

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

Фасовка:
стандартная (S)

Каталожный номер:
R1-H802-S3/9

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ	5
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	5
2.1. Метод	5
2.2. Принцип метода	5
2.3. Количество тестов	7
2.4. Состав набора.....	7
2.5. Время проведения анализа.....	7
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	7
4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	8
5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	9
6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	11
6.1. Материал для исследования	11
6.2. Взятие цельной периферической крови	11
6.3. Транспортирование и хранение исследуемого материала.....	11
6.4. Получение плазмы крови	11
7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	12
7.1. Выделение ДНК из биологического материала	12
7.2. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции	12
7.3. Загрузка теста «RHD» для детектирующих амплификаторов при первой постановке на данном компьютере	14
7.4. Ежедневная работа с тестом «RHD».....	16
8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	20
9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ	21
10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ	29
11. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	29
12. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	30
ПРИЛОЖЕНИЯ	32

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 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+). Распространённость 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 прерывалась 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 женщин с отрицательным резус-фактором для своевременного расчёта 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 косного мозга в анамнезе у матери, так как возможно получение некорректных результатов.

ИНСТРУКЦИЯ

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

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.

Полученные результаты могут использоваться в рамках пренатального скрининга осложнений течения беременностей у резус-отрицательных женщин.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Метод

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

2.2 Принцип метода

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 достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-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 (dCp).

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

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации фрагментов 7 и 10 экзонов гена RHD, включены флуоресцентные метки Fam и Rox соответственно. В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации КВМ, входит флуоресцентный краситель Hex (таблица 1).

Таблица 1 - Каналы детекции продуктов амплификации

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

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.

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.

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

2.4 Состав набора

Набор реагентов для выявления гена RHD плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени Резус-фактор плода включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 12 стрипов по 8 пробирок (по 20 мкл);
- раствор Taq-полимеразы – 2 пробирки (по 500 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- положительный контрольный образец – 1 пробирка (75 мкл).
- крышки для стрипов – 12 шт.

2.5 Время проведения анализа (без учёта 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 (таблица 6).

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 $Cp \leq 35,0$ на канале детекции КВМ (Hex). При использовании меньшего количества ДНК ($Cp > 35,0$ 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». 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.

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.

При использовании набора в клинично-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 Резус-фактор плода требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий (ДТлайт¹, ДТпрайм² или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»));
- центрифуга для пробирок объёмом 4,5 мл, с RCF не

¹ – только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2.

² – только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6.

ниже 1150 g, например, центрифуга EBA 20 Hettich (3461 g или 6000 об/мин);

- центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF не ниже 17000 g, например, центрифуга HERAEUS pico17 (17000 g);
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 65 °C до 98 °C;
- микроцентрифуга-вортекс, например BioSan, Латвия или аналогичная;
- холодильник бытовой Стинол, Россия или аналогичный;
- вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette с ЭДТА;
- 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 электронные с адаптером и/или дозаторы механические переменного объёма одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 2,0 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;
- комплект реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери (ПРОБА-НК-ФЕТ (ООО «ДНК-Технология ТС»)).

Программное обеспечение для детектирующих амплификаторов:

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

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

6.2 Взятие цельной периферической крови

Необходимый объём 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 и цитрата натрия в качестве антикоагулянта.

6.3 Транспортирование и хранение исследуемого материала

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

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

6.4 Получение плазмы крови

6.4.1 Центрифугируйте пробирки с кровью при 2000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

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

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

³ – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <http://www.dna-technology.ru/po/>

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 восьми 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 трёх 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 комплекту реагентов ПРОБА-НК-ФЕТ.

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 объёме согласно инструкции к набору реагентов для выделения ДНК.

7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

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

Несоблюдение методики проведения анализа может привести к получению некорректных результатов.

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

Пример: Необходимо проанализировать два образца. Нужно промаркировать четыре пробирки для исследуемых образцов, одну для «К+» и три для «К-» (таблица 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 с и центрифугируйте в течение 1–3 с 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 (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки стрипов.
- 7.2.5 Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа, 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 стрипованные пробирки для исследуемых образцов (2 шт. для каждого образца). В пробирки «К-», «К+» ДНК не вносится.
- 7.2.6 Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца в стрипованную пробирку, маркированную «К+». Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК, в стрипованные пробирки, маркированные «К-» (всего 3 шт.).
- 7.2.7 Центрифугируйте стрипы в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.8 Установите все стрипы в блок детектирующего амплификатора. Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.
- 7.2.9 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «RHD.ini» (7.3). Далее и при последующих постановках добавьте в протокол тест «RHD_test» (7.4),

укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (7.4.6) и проведите ПЦР.

При выборе теста «RHD_test» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

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

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

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

7.3 Загрузка теста «RHD_test» для детектирующих амплификаторов при первой постановке на данном компьютере.

Версия ПО не ниже 7.7.5.23⁴;

Примечание - Для иллюстраций в настоящей инструкции использованы скриншоты версии 7.9.5.25

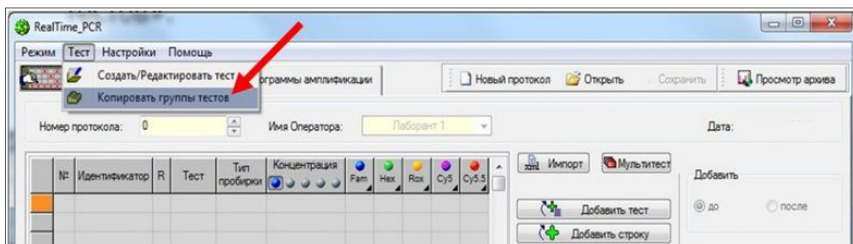
Тест «RHD_test» (файл RHD.ini) для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 предоставляется производителем набора. Его установку в программу RealTime_PCR необходимо производить в режиме «Работа с прибором» в следующем порядке:

7.3.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с набором Резус-фактор плода, выберите режим «Работа с прибором».

⁴ – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <http://www.dna-technology.ru/po/>

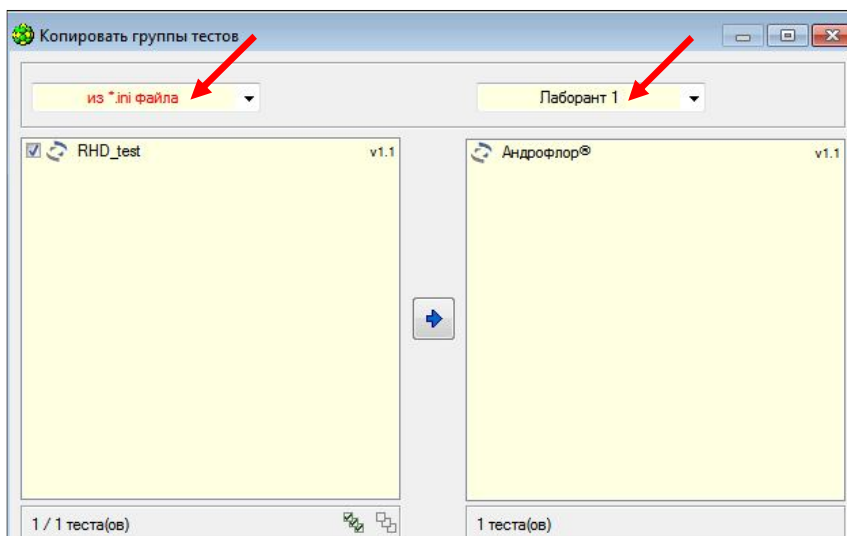
При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.


- 7.3.2 В меню «Тест» выберите закладку «Копировать группы тестов».



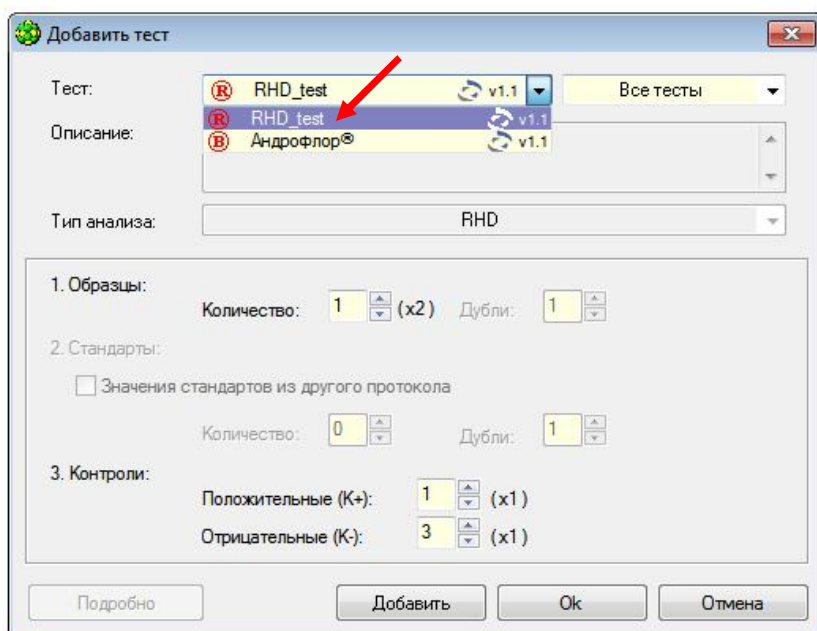
- 7.3.3 В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл «RHD.ini».

- 7.3.4 В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которого необходимо скопировать тест «RHD_test».

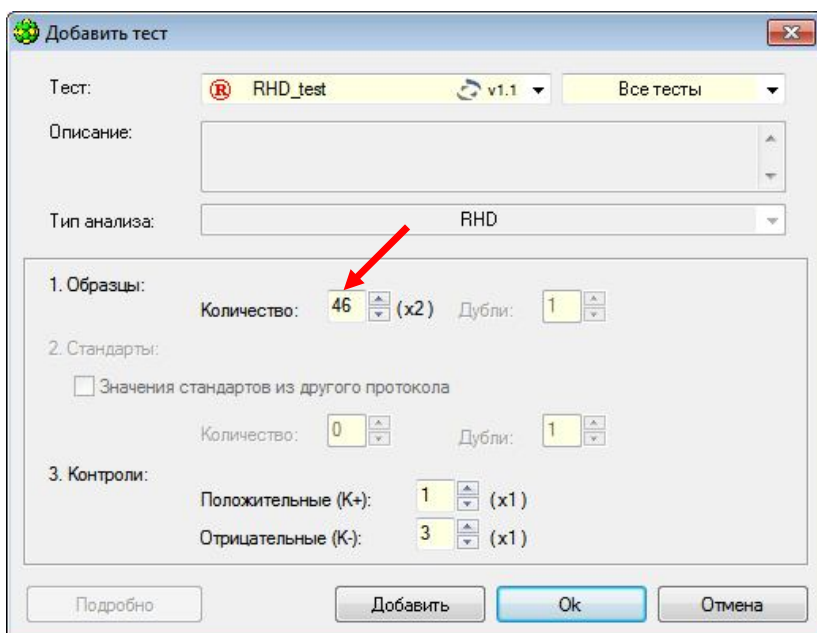


- 7.3.5 Выберите тест для копирования. Нажмите кнопку , после чего выбранный тест появится в правой половине окна.

7.4.3 Выберите из списка тест «RHD_test».



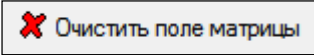

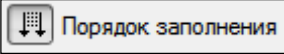
7.4.4 Укажите количество исследуемых образцов, нажмите кнопку «Ок».



7.4.5 Укажите идентификаторы пробирок.

The screenshot shows a software interface with a table of test samples and a control panel. The table has columns for '№', 'Идентификатор', 'Тест', 'Fam', 'Hex', 'Rox', and 'Cy5'. The control panel includes buttons for 'Добавить тест', 'Добавить строку', 'Удалить строку', 'Очистить протокол', and 'Отменить действие'. It also features a matrix grid with columns 1-12 and rows A-H, and options for 'Автозаполнение', 'Порядок заполнения', and 'Свободное Заполнение'.

№	Идентификатор	Тест	Fam	Hex	Rox	Cy5	
G1	73	Образец_37	RHD_test	Exon 7	KBM	Exon 10	-
G2	74			Exon 7	KBM	Exon 10	-
G3	75	Образец_38	RHD_test	Exon 7	KBM	Exon 10	-
G4	76			Exon 7	KBM	Exon 10	-
G5	77	Образец_39	RHD_test	Exon 7	KBM	Exon 10	-
G6	78			Exon 7	KBM	Exon 10	-
G7	79	Образец_40	RHD_test	Exon 7	KBM	Exon 10	-
G8	80			Exon 7	KBM	Exon 10	-
G9	81	Образец_41	RHD_test	Exon 7	KBM	Exon 10	-
G10	82			Exon 7	KBM	Exon 10	-
G11	83	Образец_42	RHD_test	Exon 7	KBM	Exon 10	-
G12	84			Exon 7	KBM	Exon 10	-
H1	85	Образец_43	RHD_test	Exon 7	KBM	Exon 10	-
H2	86			Exon 7	KBM	Exon 10	-
H3	87	Образец_44	RHD_test	Exon 7	KBM	Exon 10	-
H4	88			Exon 7	KBM	Exon 10	-
H5	89	Образец_45	RHD_test	Exon 7	KBM	Exon 10	-
H6	90			Exon 7	KBM	Exon 10	-
H7	91	Образец_46	RHD_test	Exon 7	KBM	Exon 10	-
H8	92			Exon 7	KBM	Exon 10	-
H9	93	K+	RHD_test	Exon 7	KBM	Exon 10	-
H10	94	K-	RHD_test	Exon 7	KBM	Exon 10	-
H11	95	K-	RHD_test	Exon 7	KBM	Exon 10	-
H12	96	K-	RHD_test	Exon 7	KBM	Exon 10	-

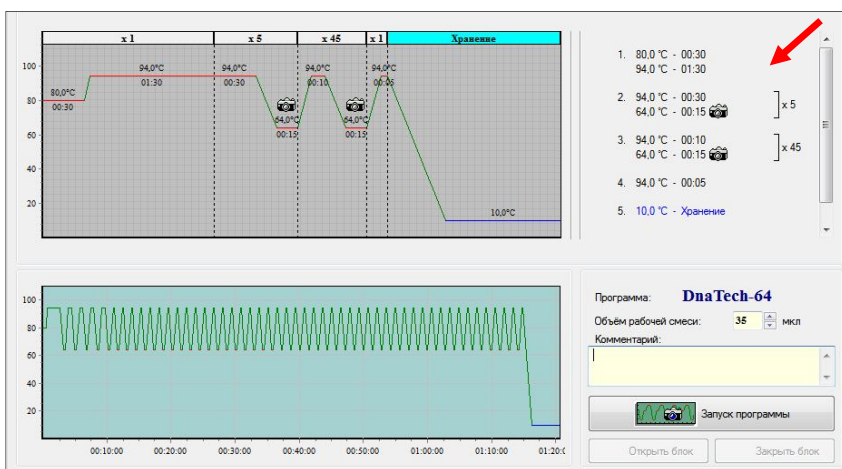
7.4.6 Отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (при необходимости нажмите кнопки «Очистить поле матрицы» -  или «Очистить протокол» -  и «Порядок заполнения» - ).

This screenshot is similar to the previous one but includes red arrows pointing to the 'Очистить протокол' button in the control panel and the 'Очистить поле матрицы' button on the matrix grid. The matrix grid shows a 12x8 grid of colored cells representing the thermal block layout.

Если термоблок не заполнен полностью, рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой термоблока.



7.4.7 Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол». В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации.



7.4.8 Нажмите кнопку «Запуск программы» в правом нижнем углу окна.

7.4.9 Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора (7.3.1)).

ВНИМАНИЕ! Необходимо сохранять протоколы исследований по определению резус-фактора плода в

течение одного года с момента проведения исследования. Обращения по результатам определения резус-фактора плода рассматриваются только при предоставлении протокола исследования.


8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

Детекция и учёт результатов осуществляются детектирующим амплификатором автоматически.

После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6 части 1 («Работа с прибором») Руководства по эксплуатации для амплификаторов детектирующих). Анализ проводится автоматически программным обеспечением.


На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла по всем используемым каналам для каждой пробирки в термоблоке (для этого необходимо выбрать

нижнюю строчку «Все каналы» ).


В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторные циклы по трем каналам (Cp), dCp и результат исследования по дублям.

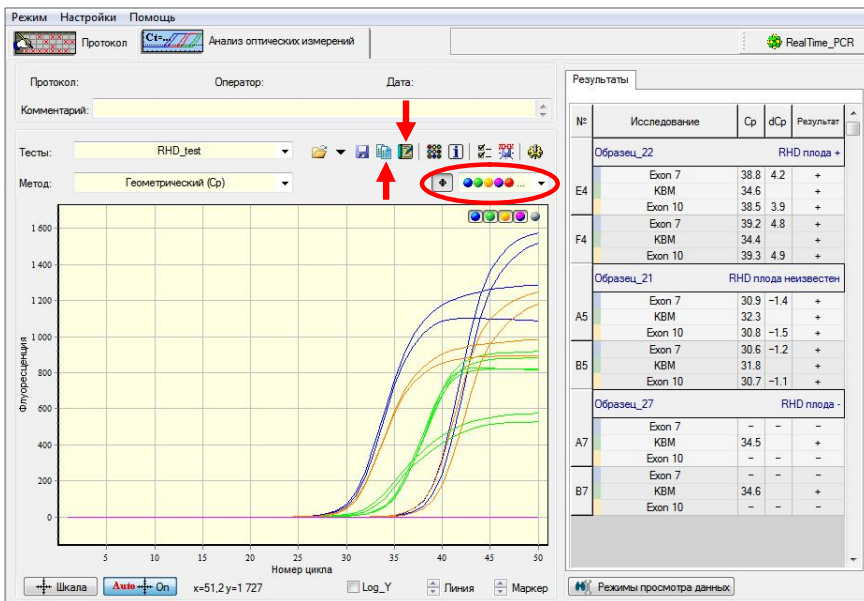
По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

Для создания лабораторного отчета необходимо нажать

кнопку «Отчет» .

Для получения бланка ответа необходимо нажать кнопку

«Бланк ответа» .



В бланк ответа автоматически включается заключение, соответствующее полученному результату (примеры бланков ответа с заключением приведены в разделе «Учет результатов реакции»).

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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 Cp KBM (канал Hex) и dCp по каналам спецификации (каналы Fam и Rox) в совокупности по дублям для этого образца (Приложение А, таблица А1).

9.3 В образцах, прошедших ПЦР и содержащих достаточное количество ДНК, для которых получены корректные значения dCp, программа определяет генотип исследуемого образца, который отображён в таблице в графе «Результат».

Примечание - Результат по каждой пробирке данного образца не является результатом исследования. Результат исследования указан в верхней графе таблицы справа рядом с идентификатором образца.

В этом случае выдается заключение по результатам исследования.

Варианты результатов исследования и бланки ответа:

№	Исследование	Ср	dСр	Результат
	Образец_22			RHD плода +
E4	Exon 7	38.8	4.2	+
	KBM	34.6		+
	Exon 10	38.5	3.9	+
F4	Exon 7	39.2	4.8	+
	KBM	34.4		+
	Exon 10	39.3	4.9	+

Образец **22**, результат исследования **RHD плода +**.

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: _____

№	Исследование	Ср	dСр	Результат
	Образец_21			RHD плода неизвестен
A5	Exon 7	30.9	-1.4	+
	KBM	32.3		+
	Exon 10	30.8	-1.5	+
B5	Exon 7	30.6	-1.2	+
	KBM	31.8		+
	Exon 10	30.7	-1.1	+

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

Бланк ответа:

Пренатальная диагностика.

Резус – фактор.

Дата
 Номер пробирики
 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: _____

№	Исследование	Ср	dСр	Результат
	Образец_27			RHD плода -
A7	Exon 7	-	-	-
	KBM	34.5		+
	Exon 10	-	-	-
B7	Exon 7	-	-	-
	KBM	34.6		+
	Exon 10	-	-	-

Образец **27**, результат исследования **RHD плода -**.

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: _____

9.4

Для образцов с недостаточным для анализа количеством ДНК ($Cp > 35,0$ на канале детекции Hex), некорректными значениями dCp , или при несовпадении результатов по дублям, программа определяет сомнительные или недостоверные результаты, в графе «Результат», справа от идентификатора образца, будет указано соответственно «?» или «нд».

№	Исследование	Cp	dCp	Результат
Образец_34		RHD плода нд		
C9	Exon 7	-	-	нд
	KBM	-	-	нд
	Exon 10	-	-	нд
D9	Exon 7	-	-	нд
	KBM	-	-	нд
	Exon 10	-	-	нд

Образец_16		RHD плода ?		
C7	Exon 7	35.6	1.8	?
	KBM	33.8		+
	Exon 10	35.2	1.4	?
C8	Exon 7	35.2	1.3	?
	KBM	33.9		+
	Exon 10	34.7	0.8	+

В этом случае заключение не выдаётся. В бланке ответа в графе «Интерпретация результата» выдаётся ответ «Необходимо повторно сдать кровь».

ВНИМАНИЕ! Бланк ответа выдаётся только в том случае,

если проведены все мероприятия, рекомендованные в пункте 9.5 (таблица 4).

Пренатальная диагностика.

Резус – фактор.

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

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: Образец_34

Название исследования	Результат	Интерпретация результата
Выявление гена резус – фактора (RHD) плода	RHD плода нд	Необходимо повторно сдать кровь.

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

Заключение:

Исследование выполнил: _____ Дата: _____
Подпись: _____

Пренатальная диагностика.

Резус – фактор.

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

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: Образец_16

Название исследования	Результат	Интерпретация результата
Выявление гена резус – фактора (RHD) плода	RHD плода ?	Необходимо повторно сдать кровь.

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

Заключение:

Исследование выполнил: _____ Дата: _____
Подпись: _____

9.5 При получении сомнительных и недостоверных результатов необходимо провести повторный анализ (таблица 4).

Таблица 4 - Принципы определения сомнительных и недостоверных результатов ПЦР

Параметры исследования	Варианты результатов		
	1	2	3
Результат по каналу Fam (Fam Cp)	$Cp \leq 41$	Не учитывается	Не учитывается
Результат по каналу Hex (Hex Cp)	$Cp \leq 35$	$Cp > 35$ или не указан	$Cp \leq 35$
Результат по каналу Rox (Rox Cp)	$Cp \leq 41$	Не учитывается	Не учитывается
dCp ((Fam Cp) минус (Hex Cp))	1,0-1,9	Не учитывается	Не учитывается
dCp ((Rox Cp) минус (Hex Cp))	1,0-1,9	Не учитывается	Не учитывается
Результат амплификации	+	«нд»	Не совпадает по дублиям
Результат исследования (ген RHD плода)	«?»	«нд»	«нд»
Интерпретация результата	Сомнительный результат ⁵	Недостоверный результат ⁶	Недостоверный результат ⁷

Причиной получения недостоверного результата может служить присутствие ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверное выполнение протокола анализа; несоблюдение температурного режима амплификации и др.

9.6 Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены результаты, приведённые в таблице 5.

Примечание - Для «К-» и «К+» в таблице результатов указываются только результаты амплификации, результат исследования указан не будет.

⁵ - необходимо повторно провести ПЦР, либо выделение ДНК и постановку ПЦР для этого образца, либо взятие клинического материала у пациента (выполняется последовательно).

⁶ - необходимо провести повторное выделение ДНК и постановку ПЦР этого образца, либо повторное взятие клинического материала у пациента (выполняется последовательно).

⁷ - необходимо повторно провести ПЦР для этого образца.

Таблица 5 - Результаты исследования для отрицательных и положительных контрольных образцов

Внесенный материал	Выбранный флуорофор		
	Fam (RHD, 7 экзон)	Hex (KBM)	Rox (RHD, 10 экзон)
«К-» (3 повтора)	Ср не указан ⁸ или >41	Ср не указан ⁸ или >39	Ср не указан ⁸ или >41
«К+»	28 ≤ Ср ≤ 32	28 ≤ Ср ≤ 32	28 ≤ Ср ≤ 32

№	Исследование	Ср	dСр	Результат
D8	K+			
	Exon 7	29.0		+
	KBM	29.2		+
	Exon 10	29.0		+
D9	K-			
	Exon 7	-		-
	KBM	-		-
	Exon 10	-		-

9.7 При получении для отрицательного контрольного образца результатов, отличающихся от значений, указанных в таблице 5, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

9.8 При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от значений, указанных в таблице 5, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

⁸ Прочерк в таблице результатов.

10 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

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 °С до 8 °С 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 утверждённой 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 защищённом от света месте в течение всего срока годности набора при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.
- 10.3.3 Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 11.1** Наборы с истекшим сроком годности и неиспользованные реактивы утилизируют в соответствии с требованиями

СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

11.2 непригодные для использования наборы реагентов, упаковка набора реагентов (пробирки, флаконы, полиэтиленовые пакеты с замком и коробки из картона) относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

12.2 Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для выявления гена RHD в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени (Резус-фактор плода), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, корп.6, тел./факс +7 (495) 640-17-71.

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, www.dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

http://www.dna-technology.ru/customer_support/

Адрес производителя и место производства:

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

Приложение А (справочное)

Принципы вычисления и интерпретации результатов исследования программным обеспечением.

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

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

Т а б л и ц а А1 - Интерпретация результатов ПЦР

Результат по каналу Fam (Fam Cp)	Результат по каналу Hex (Hex Cp)	Результат по каналу Rox (Rox Cp)	dCp ((Fam Cp) минус (Hex Cp))	dCp ((Rox Cp) минус (Hex Cp))	Интерпретация результата
Ср не указан ⁹ или >41	Ср ≤ 35	Ср не указан ⁹ или >41	-	-	Резус-фактор плода: генотипически отрицателен
Ср ≤ 41		Ср ≤ 41	Не менее 2,0	Не менее 2,0	Резус-фактор плода: генотипически положительен
Ср не указан ⁹ или >41		Ср ≤ 41	-	Не менее 2,0	
Ср ≤ 41		Ср не указан ⁹ или >41	Не менее 2,0	-	
Ср ≤ 41		Ср не указан ⁹ или >41	Менее 1,0	-	Резус-фактор беременной женщины: генотипически положителен, резус-фактор плода определить данным методом невозможно
Ср не указан ⁹ или >41		Ср ≤ 41	-	Менее 1,0	
Ср ≤ 41		Ср ≤ 41	Менее 1,0	Менее 1,0	

Примечание - dCp может принимать отрицательные значения в случае, если беременная женщина генотипически резус-положительна (Rh+).

⁹ Прочерк в таблице результатов.

Приложение Б
(справочное)

Символы, используемые при маркировке набора

	Только для in vitro диагностики
	Температурный диапазон
	Количество определений
	Годен до
	Серия набора
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Не допускается воздействие солнечного света

ДНК-Технология

117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6

Тел./факс +7 (495) 640-17-71

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