Организация-производитель

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «ДНК-Технология ТС»

_____ С.П. Левичев

«_07_» _____ 2016 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НПФ ДНК-Технология»

_____ Д.Ю. Трофимов

«_07_» _____ 2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выявления гена RHD плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени

Резус-фактор плода

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «ДНК-Технология ТС»
САМАРИН С.А.
ПОДПИСЬ
LLC

2016 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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-, плацентобиопсиии 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 кровоток 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 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).

Наименование компонентов	Количество пробирок / стрипов	Номинальный объём компонента
Фасовка S, стрипы		
Смесь для амплификации, запечатанная 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.	
Фасовка S, пробирки		
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	96 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2.2 Число 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.

2.2 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 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 (ΔCp).

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.

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

Канал детекции	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишени	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.

2.3 Время проведения анализа (без учета пробоподготовки): от 2 ч.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 клинико-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 клинико-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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор детектирующий («ДТпрайм»[1], «ДТлайт[2]» или ДТ-96 производства ООО «НПО ДНК-Технология»);
- центрифуга для пробирок объёмом 4,5 мл, с RCF не ниже 1150 g, например, центрифуга EBA 20 Hettich (3461g или 6000 об/мин);
- центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF не ниже 17000 g, например, центрифуга HERAEUS pico17 (17000 g или 13300 об/мин);
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 65 °С до 98 °С;
- 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 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 Axygen, США или аналогичные;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных

[1] только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6
[2] только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

наконечников, пробирок и других расходных материалов;

- комплект реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери (ПРОБА-НК-ФЕТ производства ООО «ДНК-Технология ТС»).

Программное обеспечение для детектирующих амплификаторов:

- версия ПО не ниже 7.7.5.23[3];
- файл с параметрами анализа «RHD.ini».

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

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

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

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

---

[3] по мере обновления программного обеспечения рекомендуемая версия ПО может измениться. Последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dnatechnology.ru/po/

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 комплекту 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 объёме 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.

7.2.1 Промаркируйте по две пробирки стрипов (или по две отдельные

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 Taq-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 Taq-полимеразы.

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

7.2.5 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 вносится.

7.2.6 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.).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2.7 Центрифугируйте стрипы (пробирки) в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.8 Установите все стрипы (пробирки) в блок детектирующего амплификатора. Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.

7.2.9 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

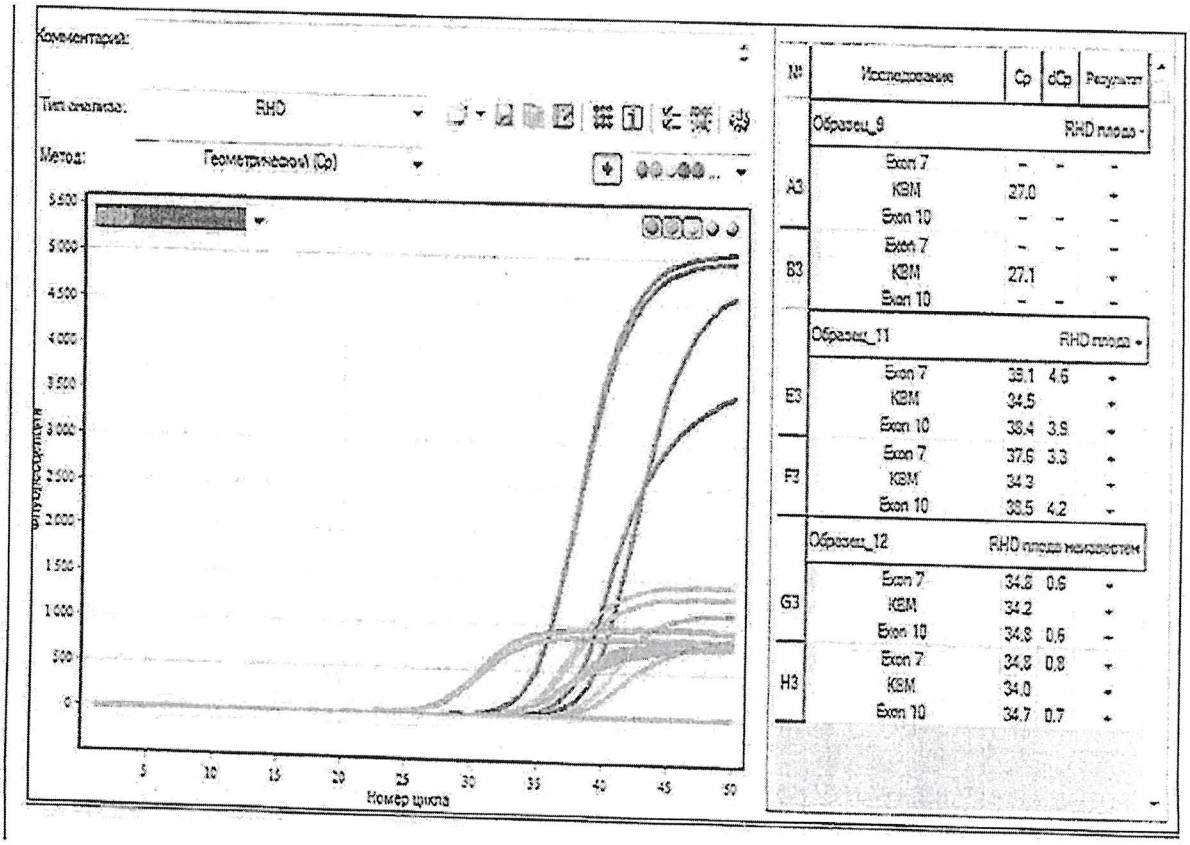
8.1 Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 Ср КВМ (канал Hex) и ΔСр по каналам специфики (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 ΔСр, 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 ответа:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

Логотип

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: Точность результата составляет 96-100% при сроке беременности более 8 недель у серологически резус-отрицательной пациентки.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Образец 22, результат исследования RHD плода +

	Образец_22			RHD плода +
C6	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

Логотип

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: Точность результата составляет 96-100% при сроке беременности более 8 недель у серологически резус-отрицательной пациентки.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

Лого

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: Точность результата составляет 96-100% при сроке беременности более 8 недель у серологически резус-отрицательной пациентки.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.4 Для образцов с недостаточным для анализа количеством ДНК (Ср>35,0 на канале детекции Hex), некорректными значениями ΔСр, 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)	Hex (КВМ)	Rox (RHD, 10 экзон)
К- (3 повтора)	Ср не указан[1] или >41	Ср не указан или >39	Ср не указан или >41
К+	28≤ Ср ≤32	28≤ Ср ≤32	28≤ Ср ≤32

[1]Прочерк 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 °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 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 утилизируются с бытовыми отходами.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приложение 1

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	-	
Cp ≤41		Cp не указан или >41,0	Менее 1,0	-	Резус-фактор беременной женщины: генотипически положителен, резус-фактор плода определить данным методом невозможно
Cp не указан или >41,0		Cp ≤41	-	Менее 1,0	
Cp ≤41		Cp ≤41	Менее 1,0	Менее 1,0	

[1]Прочерк в таблице результатов.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приложение 2

Символы, используемые при маркировке набора

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

По вопросам, касающимся качества набора реагентов Резус-фактор плода, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, к.6. 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
Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/customer_support/

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

Ведущий научный сотрудник
ООО «НПФ ДНК-Технология», Кириллов М.Ю.

«07» 11 2016 г.

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, академик РАН, профессор Г.Т. Сухих

«07» 11 2016 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru