



## ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для идентификации гена резус-фактора (RHD) плода в крови матери «ДНК-резус ребенка» и «ДНК-резус-ребенка плюс»**

(варианты на 30 определений)

ТУ 9398-001-64943561-2010

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для определения резус-фактора плода по крови резус-отрицательной беременной женщины методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из плазмы крови.

### Принцип действия:

Выявление ДНК гена резус-фактора (RHD) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа:

1. Выделение ДНК из исследуемого материала.
2. ПЦР-амплификацию ДНК с одновременной гибридационно-флуоресцентной детекцией, которая производится во время прохождения ПЦР.
3. Интерпретация результатов.

Выделение ДНК из исследуемого материала проводится с помощью рекомендованной процедуры выделения. Затем с полученными пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков генов RHD и GAPDH в реакционном буфере при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси для амплификации присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются Taq-полимеразой, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью аплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». По каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ДНК гена RHD и гена GAPDH.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Объем выделения, мкл	Методы выделения	Вид исследуемого материала	Аналитическая чувствительность
1000	рекомендованный	плазма крови	200 копий/мл
2000	рекомендованный	плазма крови	50 копий/мл

## УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

**Срок годности:** 12 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

**Транспортировка:** набор реагентов транспортировать при температуре от минус 18°C до минус 25°C. Допускается транспортировка при температуре от 2°C до 8°C не более трех суток.

**Хранение:** набор реагентов хранить при температуре от минус 18°C до минус 25°C.

**Условия отпуска:** для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

**Состав набора реагентов  
(вариант «ДНК-резус ребенка»)**

Реактив	30 тестов	
	Объем, мл	Количество пробирок
Смесь для ПЦР RHD-1	0,43	1
Смесь для ПЦР RHD-2	0,43	1
Смесь для ПЦР RHD-3	0,43	1
Смесь для ПЦР GAPDH	0,28	1
Тaq-полимераза	0,09	1
Резус-положительная контрольная ДНК (ПКО)	1,8	1
Деионизованная вода	1,16	2

**Состав набора реагентов  
(вариант «ДНК-резус ребенка плюс»)**

Реактив	30 тестов	
	Объем, мл	Количество пробирок
Смесь для ПЦР	0,79	2
Смесь праймеров RHD-1	0,43	1
Смесь праймеров RHD-2	0,43	1
Смесь праймеров RHD-3	0,43	1
Смесь праймеров GAPDH	0,28	1
Резус-положительная контрольная ДНК (ПКО)	1,29	1
Деионизованная вода	0,86	2

**МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений». При работе всегда следует выполнять следующие требования:

1. Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

**ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

2. Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

3. Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.

4. Не использовать набор по истечению срока годности.

5. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

6. Все исследуемые биологические образцы следует рассматривать как инфекционно-опасные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатитов В и С, других возбудителей.

7. Манипуляции по выделению ДНК следует проводить в отдельном помещении в специальной лабораторной одежде и одноразовых резиновых перчатках. Для очистки рабочих поверхностей необходимо использовать дезинфицирующие растворы после каждого цикла выделения ДНК.

**Чувствительность метода ПЦР позволяет исследовать минимальные количества ДНК, поэтому опасность случайного загрязнения образцов чужеродной ДНК вызывает серьезные опасения. Во избежание контаминации исследуемых образцов и компонентов наборов на различных стадиях анализа соблюдайте следующие меры предосторожности:**

- Основные три этапа работ – (I) подготовка исследуемых образцов, включая выделение ДНК; (II) подготовка образцов для ПЦР; (III) проведение ПЦР – должны быть физически изолированы, то есть, размещены в разных помещениях.

- Все лабораторное оборудование (в том числе пипетки, штативы, посуда, пластик, рабочие растворы) должно быть строго стационарным и промаркировано по принадлежности к соответствующей рабочей зоне. Запрещается перемещение оборудования из одной рабочей зоны в другую.

- Исследуемые образцы ДНК должны храниться в соответствующей зоне, отдельно от компонентов наборов для ПЦР.

- Подготовку образцов для ПЦР следует проводить в ламинарном боксе, с использованием специального комплекта пипеток и наконечников с аэрозольными фильтрами. Поверхности рабочих столов, на которых производится постановка ПЦР, должны обязательно облучаться ультрафиолетом в течение 20-30 минут до начала и после окончания работ.

- При подготовке ПЦР необходимо работать в перчатках, все наконечники и пробирки на этой стадии используются только однократно.

## **ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

1. ПЦР-бокс (например «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).

2. Вортекс (например, «ГЭТА-2», «Биоком», Россия).

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).

4. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл, до 100 мкл, до 20 мкл, до 10 мкл. (например, «Ахуген», США).

5. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,5(0,2) мл. (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

6. Холодильник от 2°C до 8°C с морозильной камерой не выше минус 16°C

7. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

8. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

9. Амплификатор роторного типа, например, «Rotor-Gine» 3000 или 6000 («Corbett Reserach», Австрия) или амплификатор планшетного типа, например, «IQ5» («BioRad», США), «Mx3000P» («Stratagene», США), или эквивалентные.

10. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:

а) на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например, «Ахуген», США) для постановки в ротор на 36 пробирок – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gine»).

б) на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Ахуген», США) – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «IQ5», «Mx3000P»).

## **АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2010 г.

**Для проведения анализа используется плазма периферической крови.**

Образец должен доставляться в лабораторию в течение 16-24 часов, после взятия материала (рекомендуется максимально ускорять доставку и осуществлять ее на льду или в термоконтейнерах при температуре плюс 4°C).

Для получения плазмы кровь (не менее 8-10 мл) отбирают в пробирку с ЭДТА. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 24 часов

(предпочтительны первые два часа) с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 10 мин при 1600 g, после чего аккуратно отбирают верхний слой плазмы и переносят его в отдельную одноразовую пробирку, избегая попадания в отбираемый материал сгустков лейкоцитов и слоев с эритроцитами. Плазму центрифугируют 10 минут при 16000 g и вновь отбирают верхний слой в отдельную пробирку, не затрагивая осадка на дне пробирки. Полученную плазму можно использовать для выделения ДНК или заморозить при температуре не выше минус 70°C для дальнейшего использования. Выделять ДНК следует не менее чем из 1,5-2,0 мл плазмы и растворять в конечном объеме 50-100 мкл.

### **ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

1. Экстракция (выделение) ДНК из исследуемых образцов.
2. Проведение амплификации с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»
3. Интерпретация результатов.

### **ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

Для экстракции ДНК рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- «ПРОБА-НК-ФЕТ» (ООО «НПО ДНК-Технология ТС», Россия)
- «ДНК-сорб-Б» («ИнтерЛабСервис», Россия)
- NucleoSpin Blood L (MACHEREY-NAGEL, Германия)
- NucleoSpin® Blood (MACHEREY-NAGEL, Германия)
- QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAamp, Германия)
- QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAamp, Германия)

### **ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

Общий объем реакции – 20 мкл.

**ВНИМАНИЕ!** Запрещено изменять объем реакции. При изменении объема чувствительность метода резко снижается!!!

**ВНИМАНИЕ!** При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free».

#### **А. Подготовка пробирок для проведения амплификации.**

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора. Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно расчетным таблицам.

1. До начала работы следует полностью разморозить при комнатной температуре все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок.

2. После размораживания тщательно перемешать содержимое пробирок (встряхнув пробирки на вортексе в течение нескольких секунд или же перевернув 10 раз), стряхнуть содержимое пробирок на дно на центрифуге.

3. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.

4. Для приготовления реакционной смеси необходимо в отдельных стерильных пробирках смешать из расчета на одну реакцию все необходимые компоненты согласно расчетным таблицам. Необходимо использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции каждой пробы.

5. При работе с малыми объемами вязких жидкостей (таких как Taq-полимераза) рекомендуется готовить микс для 5-10 реакций, чтобы отбирать автоматической пипеткой не менее 1 мкл жидкости. Отбирайте из пробирки нужный объем, не опуская наконечник глубоко в реагент, чтобы не отобрать избыточный объем фермента за счет его попадания на внешнюю поверхность наконечника.

Микс приготовить с учетом контролей и запаса на погрешность:

Вариант «ДНК-резус ребенка»

- смесь для ПЦР – 4 мкл;
- Taq-полимераза – 0,2 мкл;
- образец ДНК или контроль – 15,8 мкл.

Вариант «ДНК-резус ребенка плюс»

- смесь праймеров – 4 мкл;
- смесь для ПЦР – 4 мкл;
- образец ДНК или контроль – 12 мкл.

### Пробоподготовка

Вариант «ДНК-резус ребенка»	
Пробирка 1 (RHD-1)	Объем, мкл
Образец ДНК	15,8
Смесь для ПЦР RHD-1	4,0
Taq-полимераза	0,2
Пробирка 2 (RHD-2)	Объем, мкл
Образец ДНК	15,8
Смесь для ПЦР RHD-2	4,0
Taq-полимераза	0,2
Пробирка 3 (RHD-3)	Объем, мкл
Образец ДНК	15,8
Смесь для ПЦР RHD-3	4,0
Taq-полимераза	0,2
Пробирка 4 (GAPDH)	Объем, мкл
Образец ДНК	15,8
Смесь для ПЦР GAPDH	4,0
Taq-полимераза	0,2
Пробирка 5 (ПКО RHD-1)	Объем, мкл
Положительный контроль	15,8
Смесь для ПЦР ПКО RHD-1	4,0
Taq-полимераза	0,2
Пробирка 6 (ПКО RHD-2)	Объем, мкл
Положительный контроль	15,8
Смесь для ПЦР RHD-2	4,0
Taq-полимераза	0,2
Пробирка 7 (ПКО RHD-3)	Объем, мкл
Положительный контроль	15,8
Смесь для ПЦР RHD-3	4,0
Taq-полимераза	0,2
Пробирка 8 (ОКО RHD-1)	Объем, мкл
Деионизированная вода	15,8
Смесь для ПЦР RHD-1	4,0
Taq-полимераза	0,2
Пробирка 9 (ОКО RHD-2)	Объем, мкл
Деионизированная вода	15,8
Смесь для ПЦР RHD-2	4,0
Taq-полимераза	0,2
Пробирка 10 (ОКО RHD-3)	Объем, мкл

Вариант «ДНК-резус ребенка плюс»	
Пробирка 1 (RHD-1)	Объем, мкл
Образец ДНК	12,0
Смесь праймеров RHD-1	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
Пробирка 2 (RHD-2)	Объем, мкл
Образец ДНК	12,0
Смесь праймеров RHD-2	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
Пробирка 3 (RHD-3)	Объем, мкл
Образец ДНК	12,0
Смесь праймеров RHD-3	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
Пробирка 4 (GAPDH)	Объем, мкл
Образец ДНК	12,0
Смесь праймеров GAPDH	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
Пробирка 5 (ПКО RHD-1)	Объем, мкл
Положительный контроль	12,0
Смесь праймеров RHD-1	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
Пробирка 6 (ПКО RHD-2)	Объем, мкл
Положительный контроль	12,0
Смесь праймеров RHD-2	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
Пробирка 7 (ПКО RHD-3)	Объем, мкл
Положительный контроль	12,0
Смесь праймеров RHD-3	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
Пробирка 8 (ОКО RHD-1)	Объем, мкл
Деионизированная вода	12,0
Смесь праймеров RHD-1	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
Пробирка 9 (ОКО RHD-2)	Объем, мкл
Деионизированная вода	12,0
Смесь праймеров RHD-2	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
Пробирка 10 (ОКО RHD-3)	Объем, мкл

Деионизированная вода	15,8
Смесь для ПЦР RHD-3	4,0
Тақ-полимераза	0,2
<b>Пробирка 11 (ОКО GAPDH)</b>	<b>Объем, мкл</b>
Деионизированная вода	15,8
Смесь для ПЦР GAPDH	4,0
Тақ-полимераза	0,2

Деионизированная вода	12,0
Смесь праймеров RHD-3	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
<b>Пробирка 11 (ОКО GAPDH)</b>	<b>Объем, мкл</b>
Деионизированная вода	12,0
Смесь праймеров GAPDH	4,0
Смесь для ПЦР	4,0

## **Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».**

1. Установить пробирки в реакционный модуль.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.

### **Программа амплификации**

Цикл	Температура, °С	Время, сек.	Количество циклов
1	95	300	1
2	94	10	60
	62	50 детекция флуоресц. сигнала	

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

## **РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Регистрацию результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по одному каналу:

- по каналу FAM/Green регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации RHD и GAPDH.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов.

## **УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ**

### **Интерпретация результатов в исследуемых образцах.**

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из исследуемых образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

### **Принцип интерпретации результатов следующий:**

- НК гена резус-фактора обнаружена, если для данной пробы сигналы по каналу FAM в пробирках RHD-1, RHD-2, RHD-3 выше установленного

порогового значения, и сигнал по каналу FAM в пробирке GAPDH выше установленного порогового значения (Рис.1).

- ДНК гена резус-фактора не обнаружена, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в пробирках RHD-1, RHD-2 и RHD-3 ниже установленного порогового значения, а сигнал по каналу FAM в пробирке GAPDH выше установленного порогового значения (Рис.2).

- Результат анализа невалидный, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в пробирке GAPDH ниже установленного порогового значения.

**Если для пробы получен невалидный результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с повторного выделения ДНК из плазмы.**

- Результат анализа сомнительный, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в одной из пробирок RHD-1, RHD-2 или RHD-3 выше установленного порогового значения, а в остальных ниже установленного порогового значения или значения порогового цикла «Ct» для этих пробирок составляет более 45 (Рис.4).

- Результат анализа сомнительно-положительный, если в двух из трех пробирок RHD-1, RHD-2 или RHD-3 сигнал по каналу FAM выше установленного порогового значения, а в одной пробирке ниже установленного порогового значения.

**Если для пробы получен сомнительный результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными (рекомендуется провести дополнительное исследование пациента через несколько недель). При получении отрицательного результата по этим образцам – результат считается сомнительным.**

- Набор непригоден к дальнейшему использованию, если сигнал по каналу FAM в одной из пробирок ПКО RHD-1, ПКО RHD-2 или ПКО RHD-3 ниже установленного порогового значения и этот результат устойчиво воспроизводится.

### **Интерпретация результатов в контрольных образцах.**

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для отрицательных контролей амплификации и положительных контролей амплификации.

### **Анализ кривых флуоресценции.**

В состав диагностических наборов введен положительный контроль концентрацией 1000 копий ДНК на одну реакционную смесь. При анализе кривых флуоресценции следует учитывать, что косвенным показателем качества процедуры выделения и достаточности взятого для анализа объема является положение кривой амплификации гена GAPDH относительно кривой ПКО: значение порогового цикла для кривой GAPDH не должно превышать значения такового для ПКО более чем на 2-3 цикла (рис.1,2). Большое отличие (5 циклов и более) означает серьезные потери на этапе выделения, что ведет к уменьшению количества плодной ДНК в реакционной смеси ниже предела чувствительности тест-системы и к возможному появлению ложноотрицательных результатов (рис. 3)

Типичные графики флуоресценции приведены ниже:



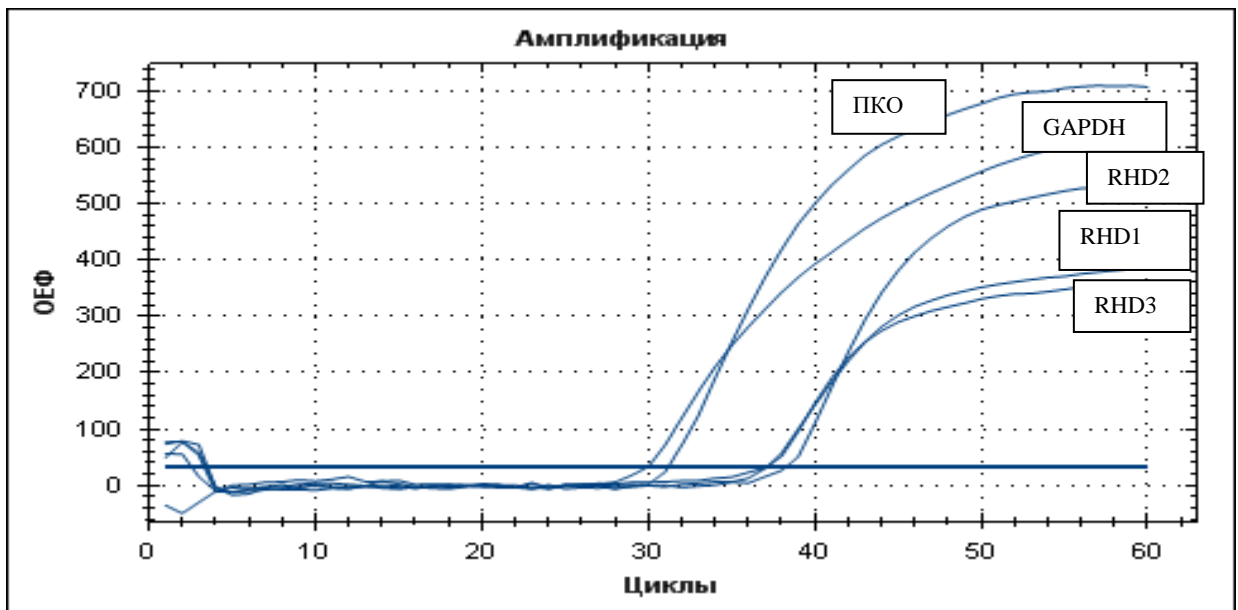


Рис.1. Пример кривых флуоресценции для анализа оптимального количества циркулирующих нуклеиновых кислот. Результат анализа – плод резус-положительный.

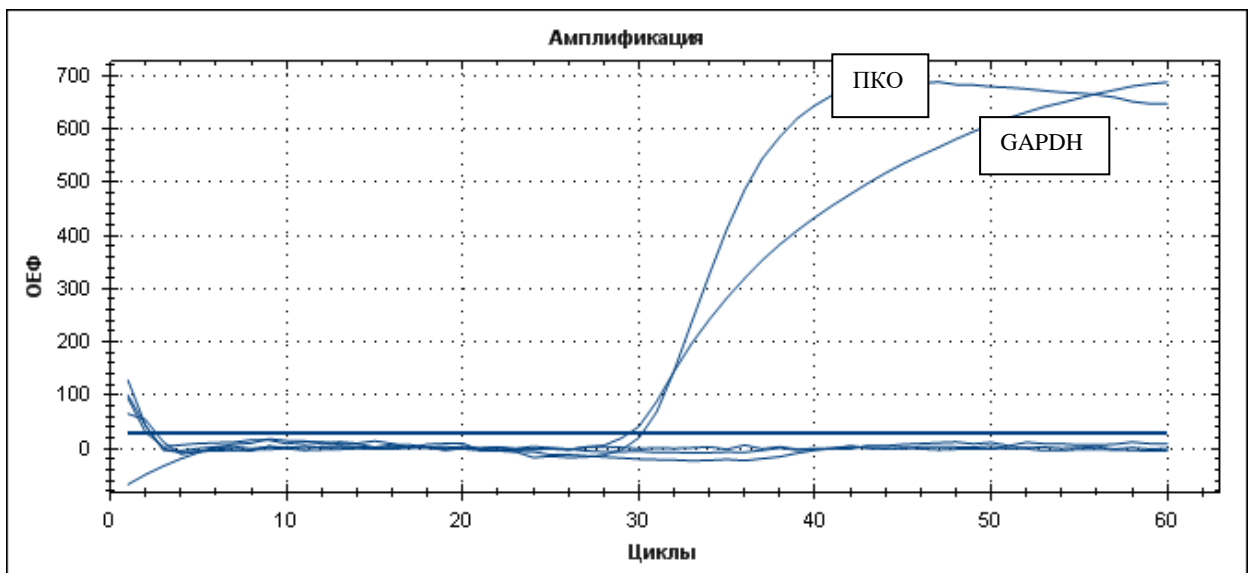


Рис.2. Пример кривых флуоресценции для анализа оптимального количества циркулирующих нуклеиновых кислот. Результат анализа – ген резус-фактора не выявлен, с вероятностью 98% плод резус-отрицательный.

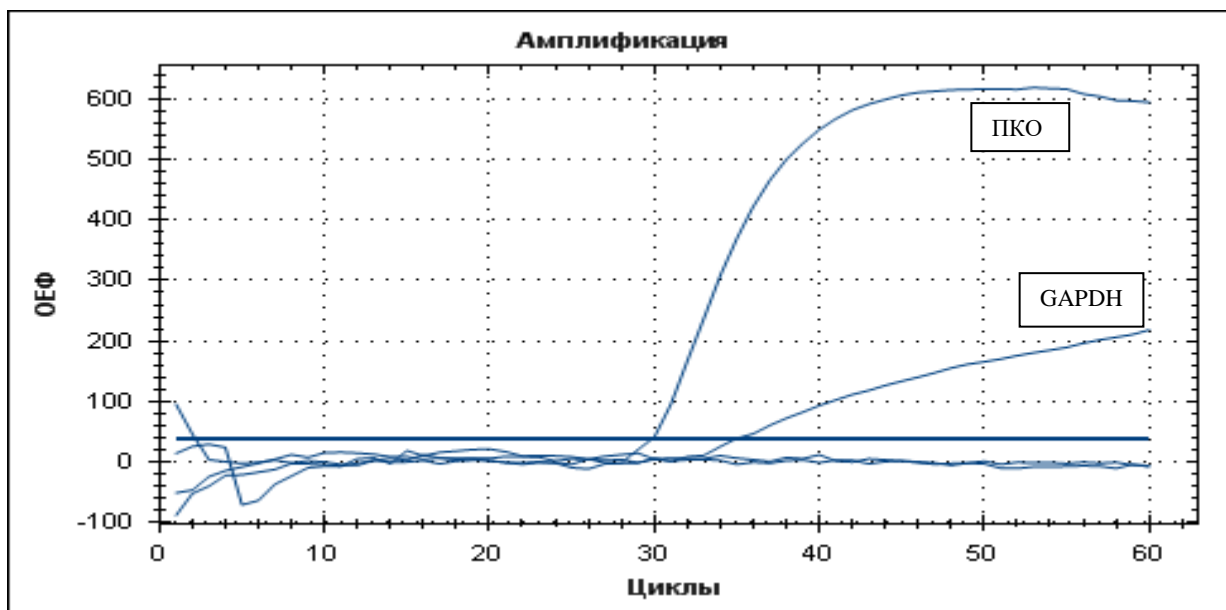


Рис.3. Пример кривых флуоресценции для анализа недостаточного количества циркулирующих нуклеиновых кислот. Вероятно появление ложноотрицательного результата, концентрация ДНК плода находится за пределами чувствительности тест-системы ( $C_t$  для GAPDH более 35 циклов). Результат анализа сомнительный, необходимо выделение ДНК из большего количества плазмы.

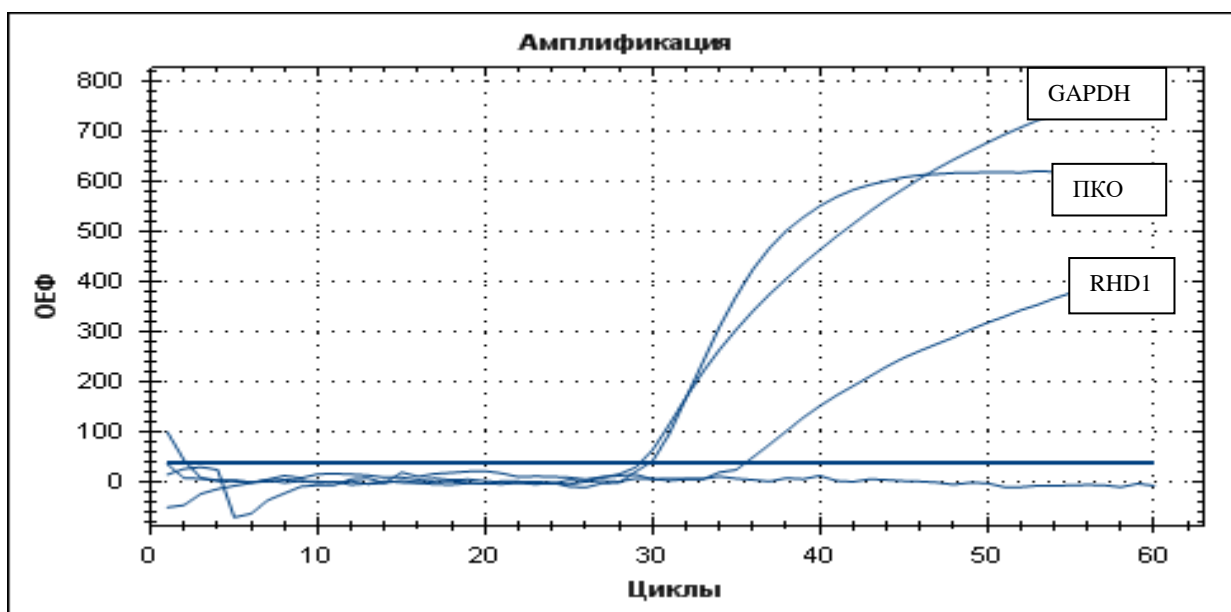


Рис.4. Результат анализа сомнительный. Проба требует повторного выделения и тестирования.