



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 50 и 100 определений)

ТУ 9398-001-64943561-2010

www.testgen.ru

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для определения резус-фактора плода по крови резус-отрицательной беременной женщины методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя **три этапа**:

- Выделение ДНК из исследуемого материала;
- ПЦР-амплификацию ДНКс одновременной гибридизационно-флуоресцентной детекцией, которая производится во время прохождения ПЦР;
- 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 специфических 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 амплификатора 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	Метод выделения	Вид исследуемого материала	Аналитическая чувствительность
200	рекомендованный	плазма крови	200 копий/мл
1000	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	Объем, мл	
	50 тестов	100 тестов
Смесь для ПЦР RHD-1	0,72	1,44
Смесь для ПЦР RHD-2	0,72	1,44
Смесь для ПЦР GAPDH	0,48	0,96
Taq-полимераза	0,1	0,2
Резус-положительная контрольная ДНК (ПКО)	1,9	3,8
Деионизованная вода	2,9	5,7

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

Реактив	Объем, мл	
	50 тестов	100 тестов
Смесь для ПЦР	1,92	3,84
Смесь праймеров RHD-1	0,72	1,44
Смесь праймеров RHD-2	0,72	1,44
Смесь праймеров GAPDH	0,48	0,96
Резус-положительная контрольная ДНК (ПКО)	1,44	2,88
Деионизованная вода	2,2	4,4

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

- 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.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
 - Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
 - Не использовать набор по истечению срока годности.
 - Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

1. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
2. Вортекс (например, «ТЭТА-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 и 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 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-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) 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-Gene»).
 - 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 термодомконтнерах при температуре минус 20°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 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 осад-

ка 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 200–300 мкл плазмы (рекомендуется 1 мл) и растворять в конечном объеме 60–100 мкл.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПЦР–исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- NucleoSpin Blood L (MACHEREY–NAGEL, Германия)
- NucleoSpin® Blood (MACHEREY–NAGEL, Германия)
- QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAamp, Германия)
- QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAamp, Германия)

или аналогичных, предназначенных для выделения циркулирующих нуклеиновых кислот из биологических жидкостей.

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 пробирку 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.

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

Стадия	Температура, °С	Время, сек.	Всего циклов
1	95	300	1
2	94	15	60
3	60	60	

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала на стадии 3.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

Пробоподготовка

Вариант «ДНК-резус ребенка»	
Пробирка 1 (RHD-1)	Объем, мкл
Образец ДНК	15,8
Смесь для ПЦР RHD-1	4,0
Тақ-полимераза	0,2
Пробирка 2 (RHD-2)	Объем, мкл
Образец ДНК	15,8
Смесь для ПЦР RHD-2	4,0
Тақ-полимераза	0,2

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 (GAPDH)	Объем, мкл
Образец ДНК	15,8
Смесь для ПЦР GAPDH	4,0
Тақ-полимераза	0,2
Пробирка 4 (PKO RHD-1)	Объем, мкл
Положительный контроль	15,8
Смесь для ПЦР RHD-1	4,0
Тақ-полимераза	0,2
Пробирка 5 (PKO RHD-2)	Объем, мкл
Положительный контроль	15,8
Смесь для ПЦР RHD-2	4,0
Тақ-полимераза	0,2
Пробирка 6 (OKO RHD-1)	Объем, мкл
Деионизованная вода	15,8
Смесь для ПЦР RHD-1	4,0
Тақ-полимераза	0,2
Пробирка 6 (OKO RHD-2)	Объем, мкл
Деионизованная вода	15,8
Смесь для ПЦР RHD-2	4,0
Тақ-полимераза	0,2
Пробирка 8 (OKO GAPDH)	Объем, мкл
Деионизованная вода	15,8
Смесь для ПЦР GAPDH	4,0
Тақ-полимераза	0,2

Пробирка 3 (GAPDH)	Объем, мкл
Образец ДНК	12,0
Смесь праймеров GAPDH	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
Пробирка 4 (PKO RHD-1)	Объем, мкл
Положительный контроль	12,0
Смесь праймеров RHD-1	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
Пробирка 5 (PKO RHD-2)	Объем, мкл
Положительный контроль	12,0
Смесь праймеров RHD-2	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
Пробирка 6 (OKO RHD-1)	Объем, мкл
Деионизованная вода	12,0
Смесь праймеров RHD-1	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
Пробирка 6 (OKO RHD-2)	Объем, мкл
Деионизованная вода	12,0
Смесь праймеров RHD-2	4,0
Смесь для ПЦР	4,0
Пробирка 8 (OKO GAPDH)	Объем, мкл
Деионизованная вода	12,0
Смесь праймеров GAPDH	4,0
Смесь для ПЦР	4,0

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регистрацию результатов поводят 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 «C_t» 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 и RHD-2 выше установленного порогового значения, и сигнал по каналу FAM в пробирке GAPDH выше установленного порогового значения.
- ДНК гена резус-фактора не обнаружена, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в пробирках RHD-1 и RHD-2 ниже установленного порогового значения, а сигнал по каналу FAM в пробирке GAPDH выше установленного порогового значения.
- 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 или RHD-2 ниже установленного порогового значения, а в другой выше установленного порогового значения или значения порогового цикла «C_t» для этих пробирок составляет более 45.

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 или ПКО RHD-2 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.

Оценка результатов анализа для исследуемых образцов

Результат по уровню флуоресценции				Результат	Примечание
Канал FAM (RHD-1)	Канал FAM (RHD-2)	Канал FAM (GAPDH)	Канал FAM (ПКО RHD-1 и ПКО RHD-2)		
Выше порогового значения	Выше порогового значения	Выше порогового значения	Выше порогового значения	ДНК гена резус-фактора обнаружена	В пробе выявлена ДНК гена резус-фактора
Ниже порогового значения	Ниже порогового значения	Выше порогового значения	Выше порогового значения	ДНК гена резус-фактора не обнаружена	В пробе не выявлена ДНК гена резус-фактора
Ниже порогового значения	Выше порогового значения	Выше порогового значения	Выше порогового значения	Сомнительный	Проба требует повторного тестирования
Выше порогового значения	Ниже порогового значения	Выше порогового значения	Выше порогового значения	Сомнительный	Проба требует повторного тестирования
		Ниже порогового значения		Невалидный	Проба требует повторного выделения и тестирования
			Ниже порогового значения		Допущены ошибки при проведении реакции или набор непригоден для использования

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Этап	Сигнал по каналу FAM	Результат
ОКО	ПЦР	Ниже порогового значения	«OK»
		Выше порогового значения	Контаминация геномной ДНК или продуктами ПЦР