

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель отдела сертификации
ООО «ТестГен»
Л.М. Халилова
(по доверенности №958 от 30 декабря 2022)
«29» августа 2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ

Набор реагентов для качественного определения гена резус-фактора RHD плода в образце плазмы крови беременной женщины с отрицательным резус-фактором методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (ПЦР-РВ) «RHD-тест» по ТУ 21.20.23-051-97638376-2021

Содержание

Список сокращений	3
Введение	4
1. Назначение	6
2. Принцип метода	6
3. Состав набора реагентов	8
4. Характеристики набора реагентов	11
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов.....	16
6. Меры предосторожности при работе с набором	20
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов.....	22
8. Анализируемые образцы.....	23
9. Подготовка компонентов набора для исследования	25
10. Проведение анализа.....	26
11. Регистрация и интерпретация результатов	29
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов.....	34
13. Утилизация	35
14. Гарантийные обязательства, контакты	37
Приложение А.....	38

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
КВМ	контроль взятия материала
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец

Введение

Пренатальное определение резус-фактора плода крайне актуально. Неинвазивное определение резус-генотипа плода у резус-отрицательных беременных женщин уже в конце первого триместра беременности путем пренатального тестирования свободно циркулирующей ДНК плода в образцах крови матери позволяет снизить затраты на ведение беременности, избежать многократного скринингового определения резус-антител и обеспечить профилактическое применение антирезусной иммунопрофилактики при резус-положительном генотипе плода¹.

Целевым анализом, выявляемым при помощи набора реагентов «RHD-тест», являются фрагменты экзонов 6, 7 и 10 гена резус-фактора *RHD*.

Научная обоснованность.

Материалом для проведения исследования служат пробы свободно циркулирующей фетальной ДНК, выделенной из плазмы периферической крови EDTA-K2 или CPDA беременной женщины. Свободно циркулирующая фетальная ДНК является продуктом распада и утилизации клеток плода, появляется в кровотоке матери в достаточном количестве с 10-ой «эмбриологической» недели беременности и составляет 3-10 % от всей циркулирующей в крови внеклеточной ДНК.

Резус-фактор крови – это белковый антигенный комплекс на поверхности эритроцитов. Лица, на эритроцитах которых присутствует антиген D, кодируемый геном *RHD*, относят к резус-положительным, а тех, кто не имеет данного антигена, – к резус-отрицательным². Наиболее специфичными участками гена *RHD* являются участки в экзонах 6, 7 и 10, поэтому именно по ним целесообразно проводить генотипирование резус-фактора.

Распространенность резус-положительных лиц-носителей антигена D в европейской популяции составляет около 85%,

¹ Клинические рекомендации «Резус-изоиммунизация Гемолитическая болезнь плода», P55, P55.0, P55.8, P55.9, P56, P56.0, P56.9. Взрослые, Дети. 2020. Разработчики: «Российское общество акушеров-гинекологов». Одобрено Научно-практическим Советом Минздрава РФ.

² Молекулярные основы D-отрицательного фенотипа (обзор литературы и описание случаев) / Л.Л. Головкина [и др.] // Онкогематология. – 2015. – Т.10, № 3 – С. 64-69.

соответственно, доля резус-отрицательных лиц, не имеющих антигена D, – около 15 %³.

Если резус-отрицательная женщина беременна резус-положительным плодом, её иммунная система начинает вырабатывать антитела к Rh-антигену, вызывающие разрушение эритроцитов плода. Как правило, антирезусные антитела отсутствуют при первой беременности резус-положительным плодом, протекающей без осложнений, однако сенсибилизация матери возникает в процессе родов. Таким образом, при каждой последующей беременности, а также при повреждении плаценты увеличивается риск гемолитической болезни плода и новорожденных (ГБПН)⁴.

По статистическим данным, частота ГБПН в Российской Федерации колеблется от 0,1 до 2,5 % и в структуре перинатальной заболеваемости и смертности составляет 9,9 % и 1,46 % от всех родившихся⁴.

Область применения набора реагентов: клиническая лабораторная диагностика, пренатальная диагностика.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: пренатальный скрининг резус-отрицательных беременных женщин с целью определения резус-фактора плода с 10-ой «эмбриологической» недели беременности, для прогнозирования риска развития резус-конфликта и гемолитической болезни плода и новорожденного.

Противопоказания к применению: при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению не выявлены.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия: набор реагентов «RHD-тест» предназначен для исследования плазмы периферической крови EDTA-K2 или CPDA беременной женщины с отрицательным резус-фактором с 10-ой «эмбриологической» недели беременности.

³ Опыт внедрения в клиническую практику методики неинвазивного пренатального исследования пола и резус-фактора плода на раннем сроке по крови беременной женщины / Л.И. Трубникова [и др.] //Ульяновский медико-биологический журнал. – 2015. – № 2 – С. 70-77.

⁴ Айламазян, Э.К. Изоиммунизация при беременности / Э.К. Айламазян, Н.Г. Павлова. – С-Пб.: Н-Л, 2012. – 27 с.

2. Назначение

Назначение: набор реагентов «RHD-тест» предназначен для качественного определения гена резус-фактора *RHD* (фрагментов экзонов 6, 7 и 10) плода в пробе свободно циркулирующей ДНК, выделенной из плазмы периферической крови EDTA-K2 или CPDA беременной женщины с отрицательным резус-фактором методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией (ПЦР-РВ) с целью прогнозирования риска развития резус-конфликта и гемолитической болезни плода и новорожденного.

Функциональное назначение: полученные результаты могут использоваться при проведении пренатального скрининга осложнений течения беременностей у женщин с отрицательным резус-фактором⁵.

Потенциальные потребители медицинского изделия

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях. Профессиональный уровень потенциальных потребителей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

2. Принцип метода

Метод

Полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридационно – флуоресцентной детекцией (ПЦР-РВ).

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения исследования служат пробы ДНК, выделенные из плазмы периферической крови EDTA-K2 или CPDA беременной женщины с отрицательным резус-фактором.

Принцип определения

Выявление ДНК гена резус-фактора (*RHD*) в экзонах 6, 7 и 10 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа:

1. Подготовку ПЦР;

⁵ Клинические рекомендации «Резус-изоиммунизация Гемолитическая болезнь плода», P55, P55.0, P55.8, P55.9, P56, P56.0, P56.9. Взрослые, Дети. 2020. Разработчики: «Российское общество акушеров-гинекологов». Одобрено Научно-практическим Советом Минздрава РФ.

2. ПЦР-амплификацию ДНК и гибридационно-флуоресцентную детекцию продуктов амплификации в режиме реального времени;

3. Интерпретацию результатов.

Выделение ДНК из исследуемого материала проводится с помощью рекомендованной процедуры выделения. Затем с полученными пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков генов *RHD* и *COMT* 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 амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». По каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ДНК гена *RHD* и гена *COMT* человека (для контроля взятия материала, далее – KBM).

KBM позволяет подтвердить факт взятия материала от человека, оценить качество, эффективность выделения ДНК и возможного наличия ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

Ограничения метода

У 1% серологически резус-отрицательных лиц определяется наличие гена *RHD*. Это происходит в следующих случаях:

- ген *RHD* присутствует и генотипически резус-фактор будет положительным, но в результате мутаций D-антиген не синтезируется и серологическим методом определяется отрицательный резус-фактор;

- ген *RHD* присутствует или присутствует частично, и генотипически резус-фактор будет положительным, но в результате мутаций синтезируется измененный D-антиген, что серологически

определяется как отрицательный или слабоположительный резус-фактор.

Такие пациентки генотипически резус-положительны, 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 по истечении срока годности применению не подлежит.

Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию.

Набор реагентов, транспортированный или хранившийся с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

Общее время проведения анализа составляет 1 ч 45 минут (без учета пробоподготовки).

2. Состав набора реагентов

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектаций:

- 1) «RHD-тест-50» – на 50 определений,
- 2) «RHD-тест-100» – на 100 определений.

Количество анализируемых проб

Наборы поставляются в двух формах комплектации – на 50 определений (660 реакций), и на 100 определений (1320 реакций), включая все положительные и отрицательные контроли. В целях компенсации потерь при раскапывании каждый набор имеет 20% запас реагентов. То есть, даже при условии единичных постановок анализов со всеми контролями реагентов в наборе формы комплектации «RHD-тест-50» или «RHD-тест-100» достаточно реактивов для постановки 60 и 120 клинических образцов, соответственно. Допускается одновременная постановка нескольких клинических образцов, в этом случае можно выполнить большее количество образцов, т.к. сокращаются расходы реактивов на положительные и отрицательные контроли.

Таблица 1 – Состав формы комплектации «RHD-тест-50»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1	ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1320 мкл
2	Праймер-микс RHD-1	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 720 мкл
3	Праймер-микс RHD-2	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 720 мкл
4	Праймер-микс RHD-3	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 720 мкл
5	Праймер-микс СОМТ	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 480 мкл
6	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1080 мкл
7	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1440 мкл

Таблица 2 – Состав формы комплектации «RHD-тест-100»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1	ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки, по 1320 мкл
2	Праймер-микс RHD-1	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	2 пробирки, по 720 мкл
3	Праймер-микс RHD-2	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	2 пробирки, по 720 мкл
4	Праймер-микс RHD-3	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	2 пробирки, по 720 мкл
5	Праймер-микс СОМТ	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	2 пробирки, по 480 мкл

6	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	3 пробирки, по 1440 мкл
7	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки, по 1440 мкл

Примечание: Эксплуатационная документация (инструкция по применению и паспорт качества) не входит в состав изделия, но входит в комплект поставки изделия. Набор реагентов, для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

ПЦР-буфер готов к использованию и содержит фермент Taq-полимеразу, оптимизированный буфер.

Праймер-миксы RHD-1, RHD-2, RHD-3 готовы к использованию и содержат: смеси праймеров (концентрация 2,5 мМ каждого) и флуоресцентных зондов (концентрация 1мМ) для экзона 6, экзона 7, экзона 10 гена RHD.

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой геномную ДНК из культуры клеток человека линии Raji в концентрации 500 копий/12 мкл раствора ДНК.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к использованию и представляет собой воду деионизованную свободную от ДНКаз и РНКаз.

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

4. Характеристики набора реагентов

4.1. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Набор реагентов «RHD-тест»

Наименование показателя	Характеристики и нормы		Пункт ТУ
1. Технические характеристики			
1.1. Внешний вид			
Наименование реагента	Внешний вид	Количество, объём, мкл (±5%)	
Форма комплектации «RHD-тест-50»			
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1320 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс RHD-1	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 720 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс RHD-2	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 720 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс RHD-3	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 720 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс СОМТ	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 480 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1080 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 1440 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Форма комплектации «RHD-тест-100»			
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки, по 1320 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс RHD-1	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	2 пробирки, по 720 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс RHD-2	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	2 пробирки, по 720 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс RHD-3	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	2 пробирки, по 720 мкл	Раздел 7, пункт 7.6

Наименование показателя	Характеристики и нормы		Пункт ТУ
Праймер-микс COMT	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	2 пробирки, по 480 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	3 пробирки, по 1440 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки, по 1440 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
1.2. Комплектность	Пункт 1.4 ТУ 21.20.23-051-97638376-2021		Раздел 7, пункт 7.9
1.3. Маркировка	Пункт 4 ТУ 21.20.23-051-97638376-2021		Раздел 7, пункт 7.9
1.4. Упаковка	Пункт 5 ТУ 21.20.23-051-97638376-2021		Раздел 7, пункт 7.9
2. Функциональные характеристики			
2.1 Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналу FAM/Green $Ct \leq 31$.		Раздел 7, пункт 7.7.4
2.2 Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналу FAM Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует).		Раздел 7, пункт 7.7.4
2.3 Прохождение реакции в пробирках с КОЧ	В пробирках с КОЧ по каналу FAM $Ct \leq 33$.		Раздел 7, пункт 7.7.4

В случае неисправности медицинского изделия, отклонений в его функционировании, которые могут влиять на безопасность, изменений аналитических характеристик изделия незамедлительно прекратить применение медицинского изделия и сообщить производителю (см. раздел 14 Инструкции).

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Набор реагентов «RHD-тест» специфичен по отношению к 6, 7 и 10 экзонам гена RHD и участку гена COMT.

4.2.2 Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

В соответствии ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом международных рекомендаций CLSI EP-17A2 предел обнаружения (LOD) определяли методом анализа разведений СОП (представляет собой геномную ДНК из культуры клеток человека линии Raji в концентрации 1000 копий/мл раствора ДНК в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА)) в диапазоне предполагаемого предела обнаружения: 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50 копий/мл.

По результатам исследования предел обнаружения ДНК гена RND в образцах объемом 1 мл с частотой выявления 95 % при использовании набора для выделения «ДНК-Плазма-М» (РУ №РЗН 2017/6140 от 23.08.2017) для амплификатора:

- ДТпрайм – 38 копий/мл (95%ДИ: 36,57 - 39,43);
- CFX 96 – 41 копий/мл (95%ДИ: 39,57 - 42,43);
- Rotor-Gene Q – 44 копий/мл (95%ДИ: 42,57 - 45,43);
- Quant Studio 5 – 38 копий/мл (95%ДИ: 36,57 - 39,43).

По результатам исследования предел обнаружения ДНК гена RND в образцах объемом 2 мл с частотой выявления 95 % при использовании набора для выделения «ДНК-Плазма-М-РТ» (РУ №РЗН 2019/9185 от 05.06.2023) для амплификатора:

- ДТпрайм – 43 копий/мл (95%ДИ: 41,57 - 44,43)
- CFX 96 – 39 копий/мл (95%ДИ: 37,57 - 40,43)
- Rotor-Gene Q – 44 копий/мл (95%ДИ: 42,57 - 45,43)
- Quant Studio 5 – 39 копий/мл (95%ДИ: 37,57 - 40,43)

4.2.3 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости положительный контрольный образец, контрольный образец чувствительности (КОЧ), стандартный образец предприятия (СОП) были исследованы по 10 повторов.

Данные по повторяемости получают внутри лаборатории для конкретного оборудования и внутри конкретной партии набора реагентов.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости рассчитывают среднее арифметическое выборки, дисперсию, среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации по полученным значениям в повторах контрольных образцов.

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 3%

4.2.4 Прецизионность в условиях воспроизводимости

Оценку воспроизводимости тест-системы проводят аналогично расчёту прецизионности в условиях повторяемости (раздел 4.2.3.), однако для тестирования используют различные партии набора реагентов, реакции ставят в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах (Блок воспроизводимости 1, Блок воспроизводимости 2, Блок воспроизводимости 3, Блок воспроизводимости 4).

При проведении прецизионности в условиях воспроизводимости наблюдалась полная внутривыставочная, межвыставочная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 5%.

4.2.5 Влияние интерферирующих веществ и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «RHD-тест» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые будут встречаться при процедуре взятия цельной периферической крови человека и при процедуре выделения ДНК из плазмы крови, могут попасть в ПЦР-реакцию и оказать влияние на способность набора реагентов «RHD-тест» определять ген резус-фактора *RHD* плода.

Интерферирующие вещества могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

- 1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);
- 2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение клинического образца компонентами крови (гемоглобин, триглицериды, билирубин) может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения ДНК;
- 3) вещества, встречающиеся при процедуре забора клинического материала – в данном случае, антикоагулянты.

Исследованные концентрации интерферирующих веществ приведены в таблице 4.

Таблица 4

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества	
Гемоглобин	260 мкг/мл
Триглицериды	37 ммоль/л
Билирубин	210 мкмоль/л
Гепарин (антикоагулянт)	3,4 мкмоль/л
Цитрат натрия (антикоагулянт)	0,1 ммоль/л
Экзогенные интерферирующие вещества	
При антикоагулянтной терапии	
Гепарин	1 МЕ/мл

На основании результатов исследования к ингибиторам ПЦР при проведении анализа отнесены следующие вещества:

1) антикоагулянты - гепарин и цитрат натрия. Не допускается использование гепарина и цитрата натрия в качестве антикоагулянта при взятии периферической крови.

2) гепарин, применяемый при антикоагулянтной терапии. Наличие гепарина в крови у пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии, может привести к получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови у таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия клинического материала.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание);

- не допускается использование образцов плазмы, загрязнённых сгустками лейкоцитов или эритроцитов в процессе отделения;

- наличие гепарина в крови у пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии, может привести к получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови у таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

4.3. Характеристики клинической эффективности

Для проведения клинических испытаний было использовано **100 образцов плазмы** периферической крови EDTA-K2 или CPDA резус-отрицательных беременных женщин (срок беременности не менее 10-й эмбриологической недели), которые были получены из банка остаточных аликвот, сформированного в процессе рутинной лечебно-диагностической практики ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

Для оценки диагностической специфичности и перекрестной реактивности в клинических испытаниях испытуемым набором реагентов «RHD-тест» были исследованы **52 образца плазмы крови** резус-отрицательных беременных женщин с резус-отрицательным фактором плода. Отрицательный статус образцов был подтвержден предоставленным предприятием-изготовителем набором сравнения «Диагностические наборы для идентификации ДНК плода в крови матери по ТУ 9398-001-97638376-2012: Набор для идентификации гена резус-фактора (RHD) плода в крови матери «Тест-RHD плюс» (для 50 и 100 определений)», производства ООО ТестГен, Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2015/2703 от 03.02.2016) в ходе проведения клинических исследований.

Количество образцов выбрано исходя из наличия образцов в банке остаточных аликвот, сформированного в процессе рутинной лечебно-диагностической ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, достаточных по объемам и удовлетворяющих параметрам программы клинического испытания, а также с учетом требований **ГОСТ Р 51352-2013** и с учетом рекомендаций Международного руководства **CLSI EP09-A3**.

Испытания проводились по средствам проспективного исследования диагностических характеристик набора реагентов «Набор реагентов для качественного определения гена резус-фактора RHD плода в образце плазмы крови беременной женщины с отрицательным резус-фактором методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (ПЦР-РВ) «RHD-тест» по ТУ 21.20.23-051-97638376-2021» на основании сопоставления результатов тестирования одних и тех же проб клинического материала испытуемым набором реагентов «RHD-тест» с результатами полученными набором сравнения «Диагностические наборы для идентификации ДНК плода в крови матери по ТУ 9398-001-97638376-2012: Набор для идентификации гена резус-фактора (RHD) плода в крови матери «Тест-RHD плюс» (для 50 и 100 определений) , производства ООО ТестГен, Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2015/2703 от 03.02.2016).

Выделение ДНК из клинических образцов осуществлялось с помощью, рекомендованных в инструкции по применению исследуемого набора «RHD-тест»:

- при выделении из 1 мл клинического образца Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из плазмы крови (ДНК-Плазма-М) по ТУ 9398-002-97638376-2015 (ООО «ТестГен», Россия), регистрационное удостоверение №РЗН 2017/6140 от 23.08.2017.

- при выделении из 2 мл клинического образца - Набор реагентов для выделения свободно циркулирующей ДНК из плазмы крови (ДНК-Плазма-М-RT) по ТУ 21.20.23-010-97638376-2017 (ООО «ТестГен», Россия), регистрационное удостоверение № РЗН 2019/9185 от 05.06.2023.

Для проведения ПЦР-исследования использовались амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США);
- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия);
- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific»,

США);

Для оценки межсерийной сходимости исследования клинических образцов проведены исследуемым медицинским изделием в двух сериях.

Свидетельством правильности работы исследуемого медицинского изделия было совпадение результатов.

При тестировании 48 положительных образцов плазмы крови резус-отрицательных беременных женщин (срок беременности не менее 10-й эмбриологической недели), испытываемым набором реагентов «RHD-тест» в двух сериях для всех четырех амплификаторов было определено, что все 48 образцов является истинноположительными по содержанию ДНК резус-фактора. Результаты определения ДНК резус-фактора совпали при тестировании всех исследованных образцов клинического материала человека испытываемым набором реагентов «RHD-тест» и набором сравнения.

При испытании 52 отрицательных образцов плазмы крови резус-отрицательных беременных женщин (срок беременности не менее 10-й эмбриологической недели) испытываемым набором реагентов «RHD-тест» в двух сериях для всех четырех амплификаторов было определено, что все 52 образца является истинноотрицательными по содержанию ДНК резус-фактора. Результаты определения ДНК резус-фактора совпали при тестировании всех исследованных образцов клинического материала человека испытываемым набором реагентов «RHD-тест» и набором сравнения.

Доверительные интервалы (ДИ) диагностических характеристик рассчитаны по методу Клоппера и Пирсона (Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper, C., & Pearson, E. (1934). The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial. *Biometrika*, 26(4), 404-413. doi:10.2261/2331986). Диагностические характеристики испытываемого набора рассчитаны с доверительной вероятностью 95 %.

Результаты исследования представлены в таблице 5.

Таблица 5

Вид исследуемого материала	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Экзон 6 гена резус-фактора <i>RHD</i>	96	104	100% (95% ДИ:96,23%-100%)	100% (95% ДИ:96,52%-100%)
Экзон 7 гена резус-фактора <i>RHD</i>	96	104		
Экзон 10 гена резус-фактора <i>RHD</i>	96	104		

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «RHD-тест»

В пограничную зону риска вошли опасности:

- потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
- контаминация реакционных смесей с образцами исследуемой ДНК содержимым из пробирки ПКО, или продуктами ПЦР;
- проведение анализа с использованием пробы ДНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);
- невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации, вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;
- использование непригодного для применения набора (использование по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для качественного определения гена резус-фактора RHD плода в образце плазмы крови беременной женщины с отрицательным резус-фактором методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (ПЦР-РВ) «RHD-тест» по ТУ 21.20.23-051-97638376-

2021», производства ООО «ТестГен» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 3 – в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «RHD-тест», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «RHD-тест», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «RHD-тест» не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работу с материалом, заражённым или подозрительным на заражённость, проводят в соответствии МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемиологических требований СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

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.

- лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса;

- использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов;

- поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 минут;

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по ПЦР-диагностике, а также лаборант со средним специальным медицинским образованием);

- не использовать набор по истечении срока годности;

- не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию;

- использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами.

При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Оборудование:

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, «Eppendorf», Германия).
4. Холодильник от 2 °С до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
5. Амплификатор⁶ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналу, соответствующего флуорофору FAM/Green: CFX96 (BioRad, США, РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016), «ДТпрайм» («ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 от 03.03.2011), Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия, РУ № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США, РУ № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019).

⁶ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, «Ахуген», США).

2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 или 2,0 мл;

3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) или оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенку пробирки) для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл; либо пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл в стрипах (например, Ахуген, США), совместимые с используемым амплификатором;

4. Отдельный халат и одноразовые перчатки без талька.

5. Емкость с дезинфицирующим раствором.

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

7. Набор для выделения ДНК из клинического материала (см п 8.3).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения исследования служат пробы ДНК, выделенные из плазмы периферической крови EDTA-K2 или CPDA беременной женщины с отрицательным резус-фактором.

8.1. Процедура взятия цельной периферической крови человека

Для получения плазмы периферическую венозную кровь (не менее 4-5 мл) отбирают в пробирку с добавленной в качестве антикоагулянта CPDA или EDTA-K2. 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.

Условия транспортирования и хранения исходного клинического материала:

При использовании пробирок с CPDA в качестве антикоагулянта допускается транспортировка цельной крови в лабораторию в течение 2 суток при температуре 4-8 °С. С момента взятия крови и получения плазмы, должно пройти не более 48 часов.

При использовании пробирок с EDTA-K2 в качестве антикоагулянта, кровь необходимо доставить в лабораторию в течение 1 часа. С момента взятия крови и получения плазмы должно пройти не более 2-3 часов.

ВНИМАНИЕ! Важно исключить замораживание и прогрев пробирки с кровью выше 25 °С.

Не брать в работу гемолизованную и хилезную кровь. При постановке анализа таких образцов могут получиться недостоверные результаты!

8.2 Процедура получения плазмы крови

Для получения плазмы пробирку с периферической венозной кровью центрифугируют 10-15 мин при 2000-3000g при комнатной температуре (от 18°С до 25°С).

Промаркировать необходимое количество пробирок типа эппендорф объемом 1,5-2,0 мл.

Аккуратно, не задевая клеточную фракцию, отобрать весь верхний слой плазмы автоматическим дозатором и перенести в отдельные одноразовые промаркированные пробирки объемом 1,5-2,0 мл. Категорически не допускается попадание в отбираемый материал сгустков лейкоцитов и слоев с эритроцитами.

Полученные пробирки объемом 1,5-2,0 мл с плазмой центрифугировать второй раз 15 минут при 13 000 g или 10 минут при 16 000 g. Автоматическим дозатором отобрать плазму, не затрагивая осадка на дне пробирки, и перенести в новые промаркированные пробирки объемом 1,5-2,0 мл.

Выделять ДНК следует не менее чем из 1 мл плазмы, рекомендуемый объем 2-3 мл полученной плазмы и элюировать в объеме 60 мкл.

Условия хранения плазмы крови:

Полученную плазму после двукратного центрифугирования допускается хранить:

- при температуре не выше 4–8 °С — не более 5 суток;
- при температуре не выше минус 20°С — в течение месяца;

- при температуре минус 70 °С — длительно.

Перед началом выделения пробирки с плазмой необходимо разморозить при комнатной температуре. Оттаивание и повторное замораживание образцов плазмы недопустимо, поскольку способно существенно снизить выход фетальной ДНК.

8.3 Процедура выделения ДНК из плазмы крови

Для экстракции ДНК из плазмы крови рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- при выделении из 1 мл клинического образца - Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из плазмы крови (ДНК-Плазма-М) по ТУ 9398-002-97638376-2015 (ООО «ТестГен», Россия), регистрационное удостоверение №РЗН 2017/6140 от 23.08.2017;

- при выделении из 2 мл клинического образца - Набор реагентов для выделения свободно циркулирующей ДНК из плазмы крови (ДНК-Плазма-М-RT) по ТУ 21.20.23-010-97638376-2017 (ООО «ТестГен», Россия), регистрационное удостоверение № РЗН 2019/9185 от 05.06.2023;

Для выполнения выделения ДНК необходимо соблюдать протокол и требования инструкции применяемого набора реагентов.

Для более достоверного результата, с полученной ДНК рекомендуется ставить ПЦР-РВ сразу после процедуры выделения.

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК

Препарат фетальной ДНК можно хранить при температуре от +2 до +8°С не более 12 часов до проведения анализа, при температуре минус 20 °С – не более 3 месяцев или при температуре минус 70 °С – не более 1 года.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

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.

Подготовка компонентов набора для исследования

1. До начала работы следует полностью разморозить при комнатной температуре все реагенты набора (необходимые в работе в текущее время).

2. После размораживания тщательно перемешать содержимое пробирок, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3-5 сек, а затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

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

Перед проведением ПЦР необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нём с применением дезинфицирующих средств, пригодных для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20-30 минут.

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

1. Подготовка ПЦР;
2. ПЦР-амплификация ДНК и гибридизационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме реального времени;
3. Интерпретация результатов.

А) Подготовка ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

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

Для приготовления реакционной смеси на 1 реакцию необходимо:

1. ПЦР-буфер – 4 мкл,
2. Соответствующий праймер-микс (RHD-1, RHD-2, RHD-3, COMT) – 4 мкл,
3. Образец (исследуемый образец ДНК, ПКО, ОКО) – 12 мкл.

Таблица 6 – Приготовление реакционных смесей

Пробирка 1 (RHD-1)	Объем, мкл
Образец ДНК	12,0
Праймер-микс RHD-1	4,0
ПЦР-буфер	4,0
Пробирка 2 (RHD-2)	Объем, мкл
Образец ДНК	12,0
Праймер-микс RHD-2	4,0
ПЦР-буфер	4,0
Пробирка 3 (RHD-3)	Объем, мкл
Образец ДНК	12,0
Праймер-микс RHD-3	4,0
ПЦР-буфер	4,0
Пробирка 4 (COMT)	Объем, мкл
Образец ДНК	12,0
Праймер-микс COMT	4,0
ПЦР-буфер	4,0
Пробирка 5 (ПКО RHD-1)	Объем, мкл
Резус-положительная контрольная ДНК (ПКО)	12,0
Праймер-микс RHD-1	4,0
ПЦР-буфер	4,0
Пробирка 6 (ПКО RHD-2)	Объем, мкл
Резус-положительная контрольная ДНК (ПКО)	12,0

Праймер-микс RHD-2	4,0
ПЦР-буфер	4,0
Пробирка 7 (ПКО RHD-3)	Объем, мкл
ПКО	12,0
Праймер-микс RHD-3	4,0
ПЦР-буфер	4,0
Пробирка 8 (ОКО RHD-1)	Объем, мкл
ОКО	12,0
Праймер-микс RHD-1	4,0
ПЦР-буфер	4,0
Пробирка 9 (ОКО RHD-2)	Объем, мкл
ОКО	12,0
Праймер-микс RHD-2	4,0
ПЦР-буфер	4,0
Пробирка 10 (ОКО RHD-3)	Объем, мкл
ОКО	12,0
Праймер-микс RHD-3	4,0
ПЦР-буфер	4,0
Пробирка 11 (ОКО СОМТ)	Объем, мкл
ОКО	12,0
Праймер-микс СОМТ	4,0
ПЦР-буфер	4,0

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл для ПЦР.

В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь для RHD: $(n+3) \times 4$ мкл ПЦР-буфера $(n+3) \times 4$ мкл праймер-микса; для СОМТ: $(n+2) \times 4$ мкл ПЦР-буфера $(n+2) \times 4$ мкл праймер-

микса где n – количество исследуемых образцов. Тщательно перемешать реакционную смесь в течение 3–5 с на вортексе, осадить капли кратковременным центрифугированием.

В соответствующие приготовленные пробирки для ПЦР внести по 8 мкл реакционной смеси согласно схеме – см. рис.1.

Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 12 мкл выделенной ДНК согласно схеме – см. рис.1. В пробирки для ПКО и ОКО препарат ДНК не вносится.

Внести в соответствующие пробирки по 12 мкл ПКО согласно схеме – см. рис.1.

Внести в соответствующие пробирки по 12 мкл ОКО согласно схеме – см. рис.1.

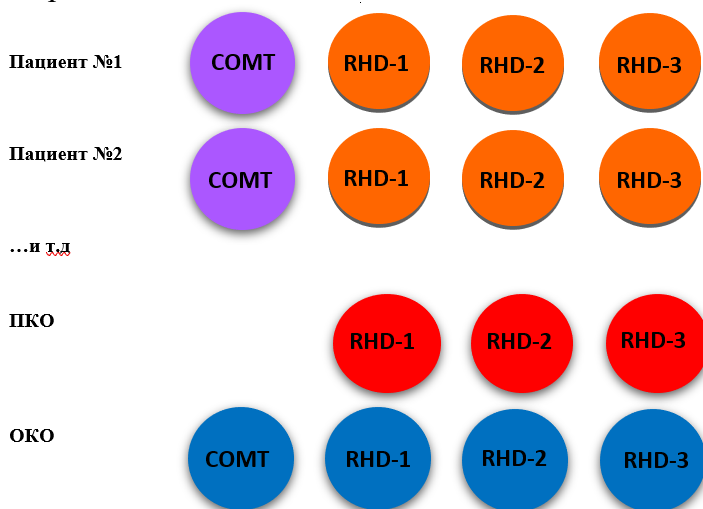


Рисунок 1 – Расстановка пробирок

Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Б) ПЦР-амплификация ДНК и гибридационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме реального времени;

(производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации)

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по

центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала по каналу FAM/Green. Протокол ПЦР указан в таблице 7.

Таблица 7 – Протокол ПЦР

Стадия	Температура, °С	Время	Всего циклов
1	95	5 мин	1
2	94	10 сек	50
3	62	50 сек	

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

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

11. Регистрация и интерпретация 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 *COMT*.

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 «Сt» в соответствующей графе в таблице результатов.

Примеры кривых флуоресценции представлены в Приложении Б к Инструкции.

Принцип интерпретации результатов для исследуемых образцов представлен в таблице 8, для контрольных образцов в таблице 9.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

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

Принцип интерпретации результатов, следующий:

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала для всех образцов и генов по оптическому каналу FAM (Green). При определении значений пороговых циклов используют метод пороговой линии (Ct). При этом пороговая линия (Threshold) устанавливается на уровне перехода кривых в экспоненциальную фазу роста.

О достаточном количестве выделенной ДНК судят по прохождению реакции гена СОМТ для исследуемого образца, пороговый цикл (Ct) которого не должен превышать пороговое значение положительного контрольного образца (ПКО) более чем на 2 цикла. Например, при значении Ct ПКО 29,5 циклов, значение Ct СОМТ для исследуемого образца должно составлять не более 31,5 – в этом случае количество и качество выделенной ДНК оценивают как достаточное и приступают к интерпретации результатов.

Результат анализа невалидный, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в пробирке СОМТ ниже установленного порогового значения или проходит позже резус-положительной контрольной ДНК (ПКО) на более 2 циклов.

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

- ДНК гена резус-фактора обнаружена, если для данной пробы сигналы по каналу FAM в трех или двух пробирках RHD-1, RHD-2 и RHD-3 выше установленного порогового значения, и сигнал по каналу FAM в пробирке СОМТ выше установленного порогового значения.

- ДНК гена резус-фактора не обнаружена, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в трех пробирках RHD-1, RHD-2 и RHD-3 ниже установленного порогового значения, а сигнал по

каналу FAM в пробирке СОМТ выше установленного порогового значения и проходит не позже чем на 2 цикла от ПКО.

- Результат анализа сомнительный, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в одной из трех пробирок RHD-1, RHD-2, или RHD-3 выше установленного порогового значения. Результат анализа сомнительный, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в одной или двух пробирках RHD-1, RHD-2, RHD-3 выше установленного порогового значения, но значение порогового цикла «Ст» для одной из этих пробирок составляет более 45.

Если для пробы получен сомнительный результат, требуется повторить выделение ДНК из большего объема плазмы или провести повторное ПЦР-исследование для данного пациента через 2 недели, начиная с повторного взятия образца крови. В случае повторения сомнительного результата образцы считать положительными.

Набор непригоден к дальнейшему использованию, если сигнал по каналу FAM в пробирке ПКО RHD-1, RHD-2, 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.

Таблица 8 - Оценка результатов анализа для исследуемых образцов

RHD-1	RHD-2	RHD-3	СОМТ	Результат
Любые значения Ct			$Ct > Ct$ (ПКО _{RHD-1,2,3}) более чем на 2 цикла или отсутствует	Результат невалидный (недостаточное количество и/или плохое качество выделенной ДНК). Требуется повторить ПЦР-исследование, начиная с повторного выделения ДНК из плазмы
Для 3 из 3 реакций получено значение Ct			$Ct \leq Ct$ (ПКО _{RHD-1,2,3}) + 2	ДНК гена резус-фактора обнаружена
Для 2 из 3 реакций $Ct \leq 45$			$Ct \leq Ct$ (ПКО _{RHD-1,2,3}) + 2	ДНК гена резус-фактора обнаружена
Для 2 из 3 реакций получено значение Ct, при этом хотя бы для одного образца $Ct > 45$			$Ct \leq Ct$ (ПКО _{RHD-1,2,3}) + 2	Сомнительный результат, требуется повторить выделение ДНК из большего объема плазмы или провести повторное ПЦР-исследование для данного пациента через 2 недели, начиная с повторного взятия образца крови. В случае повторения сомнительного результата образцы считать положительными.
Ct отсутствует у всех реакций			$Ct \leq Ct$ (ПКО _{RHD-1,2,3}) + 2	ДНК гена резус-фактора НЕ обнаружена
Для 1 из 3 реакций получено значение Ct			$Ct \leq Ct$ (ПКО _{RHD-1,2,3}) + 2	Сомнительный результат, требуется повторить выделение ДНК из большего объема плазмы или провести повторное ПЦР-исследование для данного пациента через 2 недели, начиная с повторного взятия образца крови. В случае повторения сомнительного результата образцы считать положительными.

Таблица 9 - Оценка результатов анализа для контрольных образцов

Контроль	Этап	Сигнал по каналу FAM
ОКО	ПЦР	Отсутствует
ПКО	ПЦР	$Ct \leq 35$

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 9, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 9, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 9, необходимо заменить реагенты.

Диагностическое значение полученного результата исследования:

Полученный результат анализа может быть использован квалифицированным специалистом (врачом), с учётом данных клинической картины и других видов исследований в совокупности.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

Набор реагентов «RHD-тест» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от минус 18 до минус 25 °С в течение всего срока годности набора.

После вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов «RHD-тест» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Транспортировать при температуре от минус 18 до минус 25 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8 °С не более трех суток.

Атмосферное давление не контролируется, так как не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов

помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объём и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объём термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

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

Срок годности

Срок годности набора реагентов «RHD-тест» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истёкшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от минус 18 до минус 25 °С.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

1 час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию

территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (МУ 287-113).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «RHD-тест» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует качество и безопасность набора реагентов «RHD-тест» в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования и хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с ограниченной ответственностью «ТестГен»

(ООО «ТестГен»),

432072, г. Ульяновск, 44-й Инженерный проезд, дом 9, офис 13

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 (927) 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Приложение А

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2021	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Методы испытаний.
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем(маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального применения
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования

Примеры кривых флуоресценции

1) Оценка достаточности количества выделенной ДНК

О достаточном количестве выделенной ДНК судят по прохождению реакции гена *SOMT* для исследуемого образца, пороговый цикл (C_t) которого не должен превышать пороговое значение положительного контрольного образца (ПКО) более чем на 2 цикла.

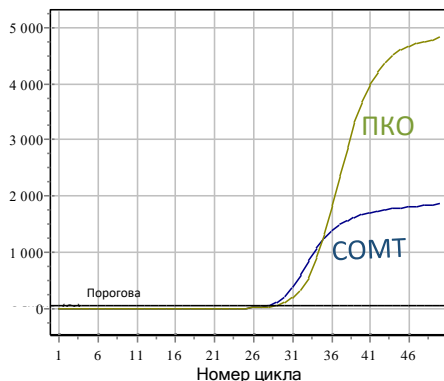


Рис. 1. Пример кривых флуоресценции хорошего выделения ДНК. Кривая флуоресценции *SOMT* выходит раньше порогового цикла ПКО, можно приступать к интерпретации результатов.

Ранний пороговый цикл *SOMT* по сравнению с пороговым циклом ПКО (рис. 1) свидетельствует о том, что выделено не **менее 500 копий циркулирующей ДНК (материнской и фетальной)**. Т.к. в среднем содержание фетальной ДНК составляет 3% от тотальной, то в этом случае можно сделать вывод о том, что выделено не менее 15 копий фетальной ДНК, что является достаточным количеством для проведения анализа.

Отставание порогового цикла *SOMT* от значения порогового цикла ПКО более чем на 2 цикла означает серьезные потери ДНК 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. 2).

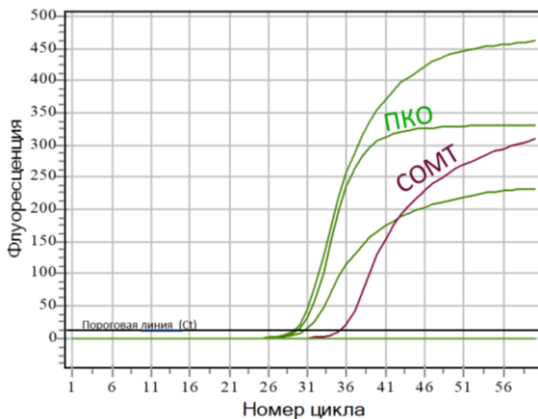


Рис. 2. Пример кривых флуоресценции для анализа недостаточного количества циркулирующих нуклеиновых кислот.

Результат анализа невалидный, необходимо повторное выделение ДНК.

2) Определение резус-фактора плода

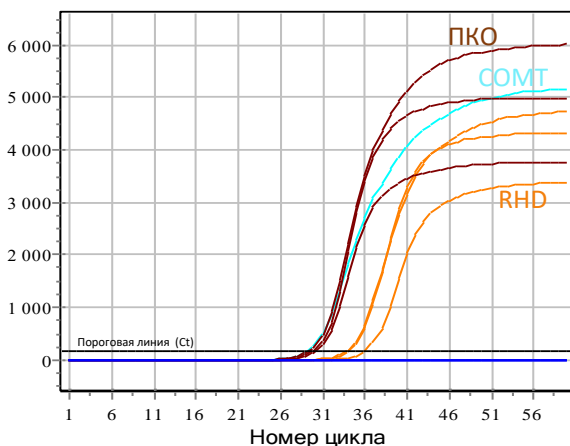


Рис. 3. Пример кривых флуоресценции для анализа оптимального количества циркулирующих нуклеиновых кислот. Кривая флуоресценции COMT выходит на одном уровне с PKO, значения RHD выше порогового уровня.

Результат анализа – «ДНК гена резус-фактора обнаружена».

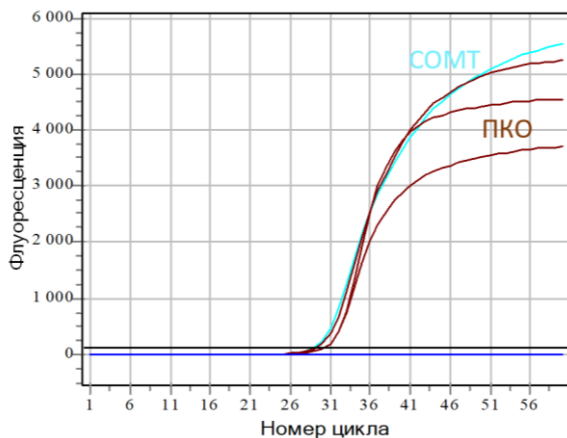


Рис. 4. Пример кривых флуоресценции для анализа оптимального количества циркулирующих нуклеиновых кислот. Кривая флуоресценции СОМТ выходит на одном уровне с ПКО, значения RHD ниже порогового уровня.

Результат анализа – «ДНК гена резус-фактора не обнаружена. Резус-фактор плода отрицательный».

О ложноотрицательном результате может свидетельствовать слишком ранний выход СОМТ (на 2 и более циклов от ПКО), в связи с разрушением клеточных элементов крови и выходом в плазму внутриклеточной ДНК (рис. 5). Причиной может послужить неправильное получение плазмы крови для проведения анализа. Требуется провести повторное ПЦР-исследование для данного пациента, начиная с повторного взятия образца крови.

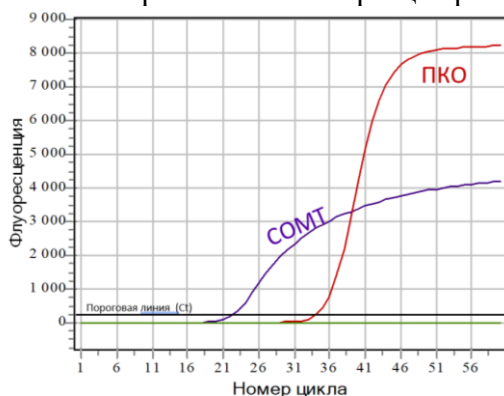


Рис. 5. Пример кривых флуоресценции раннего выхода СОМТ, возможно получение ложноотрицательного результата.

Значение пороговых циклов *RHD* для исследуемых образцов не должно отставать от значения *COMT* более чем на 10 (рис. 6), в противном случае такое сильное отставание свидетельствует о получении неспецифического сигнала амплификации.

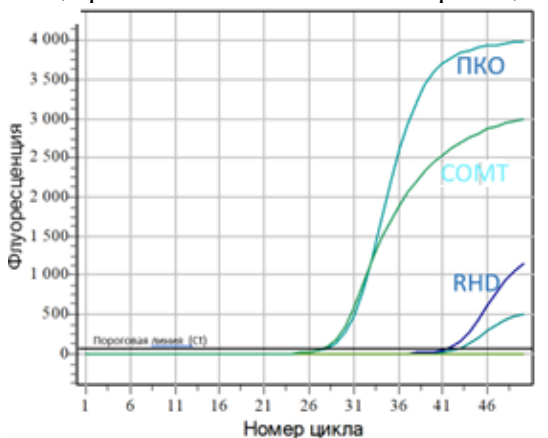


Рис. 6. Пример позднего выхода кривых *RHD*. Разница между кривой *COMT* и кривыми *RHD* более 10 циклов. Возможно получение ложноположительного результата.

Следует обратить внимание на то, что в некоторых случаях у фенотипически резус-отрицательных матерей в генотипе может выявляться функционально неактивный ген. В случае, если беременная женщина резус-положительна или имеет функционально неактивный ген, его концентрация в плазме будет равна концентрации гена *COMT*, поэтому значения пороговых циклов кривых амплификации экзонов гена *RHD* будут примерно равны кривым *COMT* (рис. 7). В таком случае определить резус-фактор плода методом ПЦР не представляется возможным.

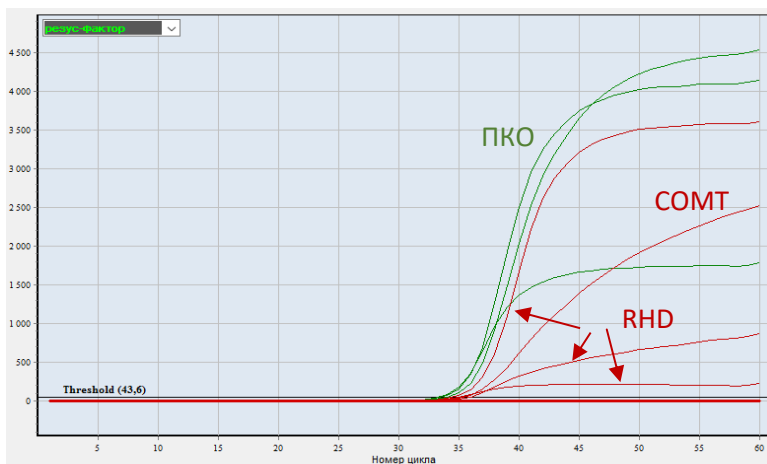


Рис. 7. Пример кривых флуоресценции при выявлении гена RHD у беременной женщины.

Оценка результатов анализа для исследуемых образцов проводится при соблюдении вышеупомянутых параметров. По результатам уровня кривых флуоресценции выдается результат.

