

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 плода<sup>1</sup>.

**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-отрицательным<sup>2</sup>. 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%,

---

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> 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 %<sup>3</sup>.

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)<sup>4</sup>.

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 родившихся<sup>4</sup>.

**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.

---

<sup>3</sup> 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.

<sup>4</sup> 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-фактором<sup>5</sup>.

### **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;

---

<sup>5</sup> 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»

<b>№ пп</b>	<b>Название реагента</b>	<b>Описание</b>	<b>Количество, объём</b>
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»

<b>№ пп</b>	<b>Название реагента</b>	<b>Описание</b>	<b>Количество, объём</b>
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
<b>1. Технические характеристики</b>			
<b>1.1. Внешний вид</b>			
Наименование реагента	Внешний вид	Количество, объём, мкл (±5%)	
<b>Форма комплектации «RHD-тест-50»</b>			
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
<b>Форма комплектации «RHD-тест-100»</b>			
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 СОМТ	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
<b>1.2. Комплектность</b>	Пункт 1.4 ТУ 21.20.23-051-97638376-2021		Раздел 7, пункт 7.9
<b>1.3. Маркировка</b>	Пункт 4 ТУ 21.20.23-051-97638376-2021		Раздел 7, пункт 7.9
<b>1.4. Упаковка</b>	Пункт 5 ТУ 21.20.23-051-97638376-2021		Раздел 7, пункт 7.9
<b>2. Функциональные характеристики</b>			
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 СОМТ.

**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 воспроизводимости, 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

<b>Интерферирующие вещества</b>	<b>Максимальная концентрация</b>
<b>Эндогенные интерферирующие вещества</b>	
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
<b>Экзогенные интерферирующие вещества</b>	
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-эпидемических 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. Амплификатор<sup>6</sup> 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).

---

<sup>6</sup> 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 гибридационно-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

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

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

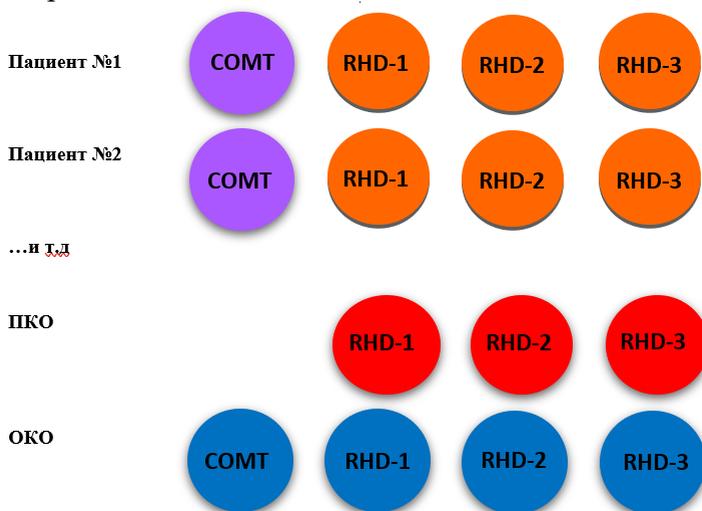


Рисунок 1 – Расстановка пробирок

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
Ct отсутствует у всех реакций			$Ct > Ct$ (ПКО <sub>RHD-1,2,3</sub> ) + 2 или $Ct < Ct$ (ПКО <sub>RHD-1,2,3</sub> ) - 2 или отсутствует	Результат невалидный (недостаточное количество и/или плохое качество выделенной ДНК). Требуется повторить ПЦР-исследование, начиная с повторного забора образца крови и выделения ДНК из плазмы
Для 3 из 3 реакций получено значение Ct			Не учитывается	ДНК гена резус-фактора <b>обнаружена</b>
Для 2 из 3 реакций $Ct \leq 45$			Не учитывается	ДНК гена резус-фактора <b>обнаружена</b>
Для 2 из 3 реакций получено значение Ct, при этом хотя бы для одного образца $Ct > 45$			Не учитывается	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 <sub>RHD-1,2,3</sub> ) + 2 или $Ct \geq Ct$ (ПКО <sub>RHD-1,2,3</sub> ) - 2	ДНК гена резус-фактора <b>НЕ обнаружена</b>
Для 1 из 3 реакций получено значение Ct			Не учитывается	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](http://www.testgen.ru)

**Служба технической поддержки:**

Тел.: +7 (927) 981 58 81

E-mail: [help@testgen.ru](mailto: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 *COMT* для исследуемого образца, пороговый цикл ( $C_t$ ) которого не должен превышать пороговое значение положительного контрольного образца (ПКО) более чем на 2 цикла.

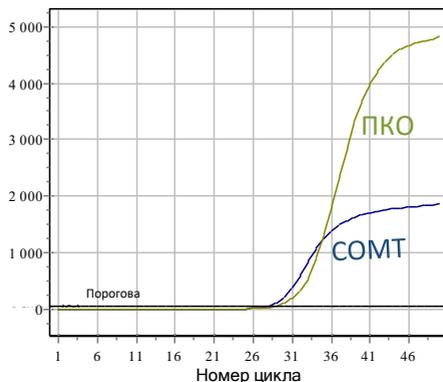


Рис. 1. Пример кривых флуоресценции хорошего выделения ДНК. Кривая флуоресценции *COMT* выходит раньше порогового цикла ПКО, можно приступать к интерпретации результатов.

Ранний пороговый цикл *COMT* 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 *COMT* 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).

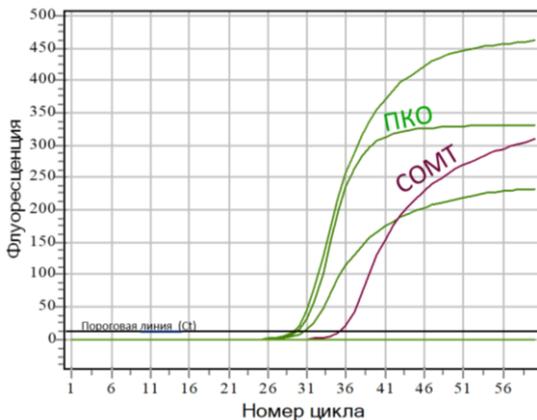


Рис. 2. Пример кривых флуоресценции для анализа недостаточного количества циркулирующих нуклеиновых кислот.

Результат анализа невалидный, необходимо повторное выделение ДНК.

## 2) Определение резус-фактора плода

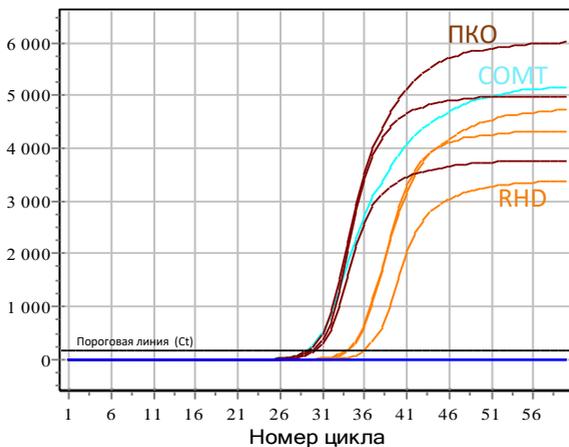


Рис. 3. Пример кривых флуоресценции для анализа оптимального количества циркулирующих нуклеиновых кислот. Кривая флуоресценции COMT выходит на одном уровне с PKO, значения RHD выше порогового уровня.

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

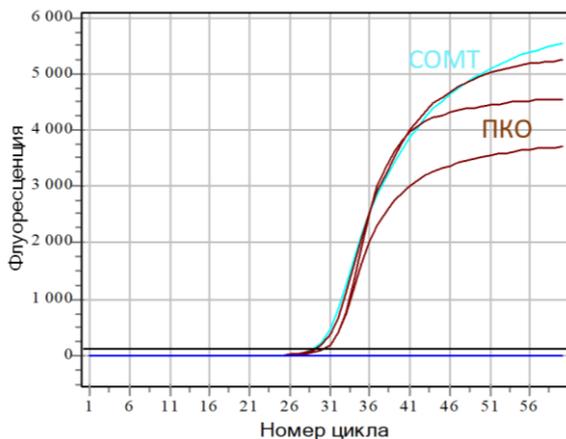


Рис. 4. Пример кривых флуоресценции для анализа оптимального количества циркулирующих нуклеиновых кислот. Кривая флуоресценции СОМТ выходит на одном уровне с ПКО, значения RHD ниже порогового уровня.

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.

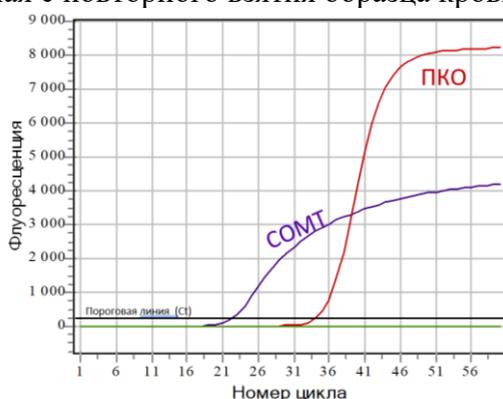


Рис. 5. Пример кривых флуоресценции раннего выхода СОМТ, возможно получение ложноотрицательного результата.

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.

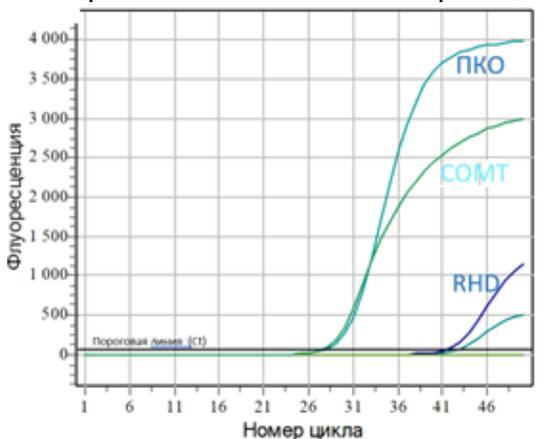


Рис. 6. Пример позднего выхода кривых *RHD*. Разница между кривой *COMT* и кривыми *RHD* более 10 циклов. Возможно получение ложноположительного результата.

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.

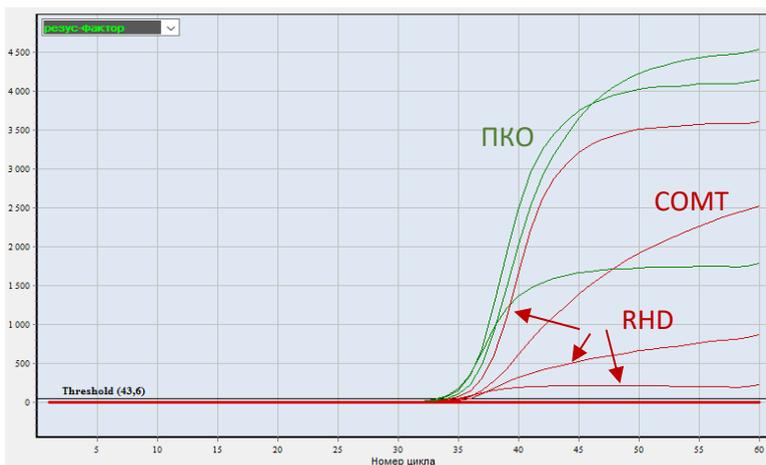


Рис. 7. Пример кривых флуоресценции при выявлении гена RHD у беременной женщины.

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