

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель организации-
заявителя

ООО «Ген-технология»

Тореповский д.п.

Ф.И.О.

«_____» _____ 20__ г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный врач ЦКБ РАН

Гончаров Н.Г.



_____ 2010

ИНСТРУКЦИЯ

Диагностические наборы для идентификации ДНК плода в крови матери:

1. Набор для идентификации гена резус-фактора (RHD) плода в крови матери "ДНК-резус ребенка" (для 50 и 100 определений).
2. Набор для идентификации гена резус-фактора (RHD) плода в крови матери "ДНК-резус ребенка плюс" (для 50 и 100 определений).
3. Набор для идентификации гена SR Y плода в крови матери "ДНК-пол ребенка" (для 50 и 100 определений).
4. Набор для идентификации гена SR Y плода в крови матери "ДНК-пол ребенка плюс" (для 50 и 100 определений).

1. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
<i>RHD</i>	ген резус-фактора
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ПКО	положительный контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
SRY	ген половой принадлежности
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ПКО	положительный контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец

2. НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

3. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

для определения резус-фактора плода.

3.1. Принцип действия

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

- 1) экстракцию (выделение) ДНК из исследуемого материала;
- 2) ПЦР-амплификацию ДНК;
- 3) гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится во время прохождения ПЦР.
- 4) интерпретация результатов

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

3.2. Состав набора

Набор реагентов (вариант «ДНК-резус ребенка») для проведения 50 определений включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
Смесь для ПЦР <i>RHD</i> -1	Прозрачная жидкость розового цвета	0,72	1 пробирка
Смесь для ПЦР <i>RHD</i> -2	Прозрачная жидкость розового цвета	0,72	1 пробирка
Смесь для ПЦР <i>GAPDH</i>	Прозрачная жидкость розового цвета	0,48	1 пробирка
Таq-полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
Резус-положительная контрольная ДНК (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1,9	2 пробирки
Деионизованная вода	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

Набор реагентов (вариант «ДНК-резус ребенка») для проведения 100 определений включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
Смесь для ПЦР RHD-1	Прозрачная жидкость розового цвета	1,44	1 пробирка
Смесь для ПЦР RHD-2	Прозрачная жидкость розового цвета	1,44	1 пробирка
Смесь для ПЦР GARDH	Прозрачная жидкость розового цвета	0,96	1 пробирка
Тaq-полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Резус-положительная контрольная ДНК (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	3,8	4 пробирки
Деионизованная вода	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

Набор реагентов (вариант «ДНК-резус ребенка плюс») для проведения 50 определений включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
Смесь для ПЦР	Прозрачная бесцветная жидкость	1,92	2 пробирки
Смесь праймеров RHD-1	Прозрачная жидкость розового цвета	0,72	1 пробирка
Смесь праймеров RHD-2	Прозрачная жидкость розового цвета	0,72	1 пробирка
Смесь праймеров GAPDH	Прозрачная жидкость розового цвета	0,48	1 пробирка
Резус-положительная контрольная ДНК (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1,9	2 пробирки
Деионизованная вода	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

Набор реагентов (вариант «ДНК-резус ребенка плюс») для проведения 100 определений включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
Смесь для ПЦР	Прозрачная бесцветная жидкость	3,84	4 пробирки
Смесь праймеров RHD-1	Прозрачная жидкость розового цвета	1,44	1 пробирка
Смесь праймеров RHD-2	Прозрачная жидкость розового цвета	1,44	1 пробирка
Смесь праймеров GAPDH	Прозрачная жидкость розового цвета	0,96	1 пробирка
Резус-положительная контрольная ДНК (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	3,8	4 пробирки
Деионизованная вода	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА для определения пола плода

4.1. Принцип действия

Выявление ДНК гена половой принадлежности (*SRY*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя четыре этапа:

- 1) экстракцию (выделение) ДНК из исследуемого материала;
- 2) ПЦР-амплификацию ДНК;
- 3) гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится во время прохождения ПЦР.
- 4) интерпретация результатов

Экстракция ДНК из исследуемого материала проводится с помощью рекомендованной процедуры выделения. Затем с полученными пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков генов *SRY* и *GAPDH* в реакционном буфере при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси для амплификации присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются Таq-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 *SRY* и гена *GAPDH*.

4.2. Состав набора

Набор реагентов (вариант «ДНК-пол ребенка») для проведения 50 определений включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
Смесь для ПЦР SRY	Прозрачная жидкость розового цвета	0,72	1 пробирка
Смесь для ПЦР GAPDH	Прозрачная жидкость розового цвета	0,48	1 пробирка
Тaq-полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,08	1 пробирка
Мужская контрольная ДНК (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,95	1 пробирка
Деионизованная вода	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

Набор реагентов (вариант «ДНК-пол ребенка») для проведения 100 определений включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
Смесь для ПЦР SRY	Прозрачная жидкость розового цвета	1,44	1 пробирка
Смесь для ПЦР GAPDH	Прозрачная жидкость розового цвета	0,96	1 пробирка
Тaq-полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,16	1 пробирка
Мужская контрольная ДНК (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1,9	2 пробирки
Деионизованная вода	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

Набор реагентов (вариант «ДНК-пол ребенка плюс») для проведения 50 определений включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
Смесь для ПЦР	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Смесь праймеров SRY	Прозрачная жидкость розового цвета	0,72	1 пробирка
Смесь праймеров GAPDH	Прозрачная жидкость розового цвета	0,48	1 пробирка
Мужская контрольная ДНК (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,95	1 пробирка
Деионизованная вода	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

Набор реагентов (вариант «ДНК-пол ребенка плюс») для проведения 100 определений включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
Смесь для ПЦР	Прозрачная бесцветная жидкость	2,4	2 пробирки
Смесь праймеров SRY	Прозрачная жидкость розового цвета	1,44	1 пробирка
Смесь праймеров GAPDH	Прозрачная жидкость розового цвета	0,96	1 пробирка
Мужская контрольная ДНК (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1,9	2 пробирки
Деионизованная вода	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ набора для определения резус-фактора плода

Объем выделения, мкл	Метод выделения	Вид исследуемого материала	Аналитическая чувствительность
200	Рекомендованный	Плазма крови	200 копий/мл
1000	Рекомендованный	Плазма крови	50 копий/мл

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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

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

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

7. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

1. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
4. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл, до 100 мкл, до 20 и до 10 мкл. (например, «Ахуген», США).

5. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,5 (0,2) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
6. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
7. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
8. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.
9. Амплификатор роторного типа, например, «Rotor-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) или амплификатор планшетного типа, например, «iQ5» («BioRad», США), «Mx3000P» («Stratagene», США) или эквивалентные.
10. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
 - а) на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например «Ахуген», США) для постановки в ротор на 36 пробирок – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»).
 - б) на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Ахуген», США) – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «iQ5», «Mx3000P»).

8. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Для проведения анализа используется следующий материал:

- плазма периферической крови.

Образец должен доставляться в лабораторию в течение 16-24 ч после взятия материала (рекомендуется максимально ускорять доставку и осуществлять ее на льду или в термоконтейнерах при температуре минус 20°С).

Для получения плазмы кровь (не менее 8-10 мл) отбирают в пробирку с ЭДТА. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 24 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 10 мин при 1600g, после чего аккуратно отбирают верхний слой плазмы и переносят его в отдельную одноразовую пробирку, избегая попадания в отбираемый материал сгустков лейкоцитов и слоев с эритроцитами. Плазму центрифугируют 10 минут при 1600g и вновь отбирают верхний слой в отдельную пробирку, не затрагивая осадка на дне пробирки. Полученную плазму можно использовать для выделения ДНК или заморозить при температуре не выше минус 70°С

для дальнейшего использования. Выделять ДНК следует не менее чем из 200-300 мкл плазмы (рекомендуется 1 мл) и растворять в конечном объеме 60-100 мкл.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

(производится в помещении для обработки исследуемого материала)

Для экстракции ДНК рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

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

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Общий объем реакции – 20 мкл.

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

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

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации

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

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

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

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

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

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

5. При работе с малыми объемами вязких жидкостей (таких как Taq-полимераза) рекомендуется готовить микс для 8-16 реакций, чтобы отбирать автоматической пипеткой не менее 1 мкл жидкости. Отбирайте из пробирки нужный объем, не опуская наконечник глубоко в реагент, чтобы не отобрать избыточный объем фермента за счет его попадания на внешнюю поверхность наконечника.

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

1. Установить пробирки в реакционный модуль.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.

Программа амплификации

Стадия	Температура, °C	Время	Всего циклов
1	95	5 мин	1
2	94	15 сек	60
3	60	1 мин	

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

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

Вариант «ДНК-резус ребенка»

Пробирка 1 (RHD-1)	Объем
Образец ДНК	15,8 мкл
Смесь для ПЦР RDH-1	4,0 мкл
<i>Taq</i> -полимераза	0,2 мкл

Пробирка 2 (RHD-2)	Объем
Образец ДНК	15,8 мкл
Смесь для ПЦР RDH-2	4,0 мкл
<i>Taq</i> -полимераза	0,2 мкл

Пробирка 3 (GAPDH)	Объем
Образец ДНК	15,8 мкл
Смесь для ПЦР GAPDH	4,0 мкл
<i>Taq</i> -полимераза	0,2 мкл

Пробирка 4 (ИКО RHD-1)	Объем
Положительный контроль	15,8 мкл
Смесь для ПЦР RHD-1	4,0 мкл
<i>Taq</i> -полимераза	0,2 мкл

Пробирка 5 (ИКО RHD-2)	Объем
Положительный контроль	15,8 мкл
Смесь для ПЦР RHD-2	4,0 мкл
<i>Taq</i> -полимераза	0,2 мкл

Пробирка 6 (ОКО RHD-1)	Объем
Деионизованная вода	15,8 мкл
Смесь для ПЦР RHD-1	4,0 мкл
<i>Taq</i> -полимераза	0,2 мкл

Пробирка 7 (ОКО RHD-2)	Объем
Деионизованная вода	15,8 мкл
Смесь для ПЦР RHD-2	4,0 мкл
<i>Taq</i> -полимераза	0,2 мкл

Пробирка 8 (ОКО GAPDH)	Объем
Деионизованная вода	15,8 мкл
Смесь для ПЦР GAPDH	4,0 мкл
<i>Taq</i> -полимераза	0,2 мкл

Вариант «ДНК-резус ребенка плюс»

Пробирка 1 (RHD-1)	Объем
Образец ДНК	12,0 мкл
Смесь праймеров RDH-1	4,0 мкл
Смесь для ПЦР	4,0 мкл

Пробирка 2 (RHD-2)	Объем
Образец ДНК	12,0 мкл
Смесь праймеров RHD-2	4,0 мкл
Смесь для ПЦР	4,0 мкл

Пробирка 3 (GAPDH)	Объем
Образец ДНК	12,0 мкл
Смесь праймеров GAPDH	4,0 мкл
Смесь для ПЦР	4,0 мкл

Пробирка 4 (ПКО RHD-1)	Объем
Положительный контроль	12,0 мкл
Смесь праймеров RHD-1	4,0 мкл
Смесь для ПЦР	4,0 мкл

Пробирка 5 (ПКО RHD-2)	Объем
Положительный контроль	12,0 мкл
Смесь праймеров RHD-2	4,0 мкл
Смесь для ПЦР	4,0 мкл

Пробирка 6 (ОКО RHD-1)	Объем
Деионизованная вода	12,0 мкл
Смесь праймеров RHD-1	4,0 мкл
Смесь для ПЦР	4,0 мкл

Пробирка 7 (ОКО RHD-2)	Объем
Деионизованная вода	12,0 мкл
Смесь праймеров RHD-2	4,0 мкл
Смесь для ПЦР	4,0 мкл

Пробирка 8 (ОКО GAPDH)	Объем
Деионизованная вода	12,0 мкл
Смесь праймеров GAPDH	4,0 мкл
Смесь для ПЦР	4,0 мкл

10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

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

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

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

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК гена резус-фактора обнаружена, если для данной пробы сигналы по каналу **FAM** в пробирках *RHD-1* и *RHD-2* выше установленного порогового значения, и сигнал по каналу **FAM** в пробирке *GAPDH* выше установленного порогового значения

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

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

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

- Результат анализа сомнительный, если для данной пробы сигнал по каналу **FAM** в одной из пробирок *RHD-1* или *RHD-2* ниже установленного порогового значения, а в другой – выше установленного порогового значения или значения порогового цикла « C_t » для этих пробирок составляет более 45.

Если для пробы получен сомнительный результат, требуется повторить ПЦР-

исследование соответствующего исследуемого образца. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными (рекомендуется провести дополнительное исследование пациента через несколько недель). При получении отрицательного результата по этим образцам – результат считается сомнительным.

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

Интерпретация результатов в контрольных образцах

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

12. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ набора реагентов для определения пола плода

Объём выделения, мкл	Метод выделения	Вид исследуемого материала	Аналитическая чувствительность
200	Рекомендованный	Плазма крови	200 копий/мл
1000	Рекомендованный	Плазма крови	50 копий/мл

13. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

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

14. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

1. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
4. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл, до 100 мкл, до 20 и до 10 мкл. (например, «Ахуген», США).
5. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,5 (0,2) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
6. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
7. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
8. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.
9. Амплификатор роторного типа, например, «Rotor-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) или амплификатор планшетного типа, например, «iQ5» («BioRad», США), «Mx3000P» («Stratagene», США) или эквивалентные.
10. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
 - а) на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например «Ахуген», США) для постановки в ротор на 36 пробирок – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»).
 - б) на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Ахуген», США) – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «iQ5», «Mx3000P»).

15. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Для проведения анализа используется следующий материал:

- плазма периферической крови.

Образец должен доставляться в лабораторию в течение 16-24 ч после взятия материала (рекомендуется максимально ускорять доставку и осуществлять ее на льду или в термоконтейнерах при температуре минус 20°С).

Для получения плазмы кровь (не менее 8-10 мл) отбирают в пробирку с ЭДТА. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 24 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 10 мин при 1600g, после чего аккуратно отбирают верхний слой плазмы и переносят его в отдельную одноразовую пробирку, избегая попадания в отбираемый материал сгустков лейкоцитов и слоев с эритроцитами. Плазму центрифугируют 10 минут при 16000g и вновь отбирают верхний слой в отдельную пробирку, не затрагивая осадка на дне пробирки. Полученную плазму можно использовать для выделения ДНК или заморозить при температуре не выше минус 70°C для дальнейшего использования. Выделять ДНК следует не менее чем из 200-300 мкл плазмы (рекомендуется 1 мл) и растворять в конечном объеме 60-100 мкл.

16. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

(производится в помещении для обработки исследуемого материала)

Для экстракции ДНК рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

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

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Общий объем реакции – 20 мкл.

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

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

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Установить пробирки в реакционный модуль.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.

Программа амплификации

Стадия	Температура, °C	Время	Всего циклов
1	95	5 мин	1
2	94	15 сек	60
3	60	1 мин	

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

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

Вариант «ДНК-пол ребенка»

Пробирка 1 (SRY)	Объем
Образец ДНК	15,8 мкл
Смесь для ПЦР SRY	4,0 мкл
Taq-полимераза	0,2 мкл

Пробирка 2 (GAPDH)	Объем
Образец ДНК	15,8 мкл
Смесь для ПЦР GAPDH	4,0 мкл
Taq-полимераза	0,2 мкл

Пробирка 3 (ОКО SRY)	Объем
Положительный контроль	15,8 мкл
Смесь для ПЦР SRY	4,0 мкл
Taq-полимераза	0,2 мкл

Пробирка 4 (ОКО SRY)	Объем
Деионизованная вода	15,8 мкл
Смесь для ПЦР SRY	4,0 мкл
Taq-полимераза	0,2 мкл

Пробирка 5 (ОКО GAPDH)	Объем
Деионизованная вода	15,8 мкл
Смесь для ПЦР GAPDH	4,0 мкл
Taq-полимераза	0,2 мкл

Вариант «ДНК-пол ребенка плюс»

Пробирка 1 (SRY)	Объем
Образец ДНК	12,0 мкл
Смесь праймеров SRY	4,0 мкл
Смесь для ПЦР	4,0 мкл

Пробирка 2 (GAPDH)	Объем
Образец ДНК	12,0 мкл
Смесь праймеров GAPDH	4,0 мкл
Смесь для ПЦР	4,0 мкл

Пробирка 3 (НКО SRY)	Объем
Положительный контроль	12,0 мкл
Смесь праймеров SRY	4,0 мкл
Смесь для ПЦР	4,0 мкл

Пробирка 4 (ОКО SRY)	Объем
Деионизованная вода	12,0 мкл
Смесь праймеров SRY	4,0 мкл
Смесь для ПЦР	4,0 мкл

Пробирка 5 (ОКО GAPDH)	Объем
Деионизованная вода	12,0 мкл
Смесь праймеров GAPDH	4,0 мкл
Смесь для ПЦР	4,0 мкл

17. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

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

18. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

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

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК гена половой принадлежности обнаружена, если для данной пробы сигналы по каналу FAM в пробирке *SRY* выше установленного порогового значения, и сигнал по каналу FAM в пробирке *GAPDH* выше установленного порогового значения

- ДНК гена половой принадлежности не обнаружена, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в пробирке *SRY* ниже установленного порогового значения, а сигнал по каналу FAM в пробирке *GAPDH* выше установленного порогового значения.

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

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

- Результат анализа сомнительный, если для данной пробы значение порогового цикла «C_t» для сигнала по каналу FAM в пробирке ПКО *SRY* более 45.

Если для пробы получен сомнительный результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными (рекомендуется

провести дополнительное исследование пациента через несколько недель). При получении отрицательного результата по этим образцам – результат считается сомнительным.

Набор непригоден к дальнейшему использованию, если сигнал по каналу FAM в пробирке ПКО SRY 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.

Удостоверяю,
Директор
(должность)



(подпись) печать Заявителя)

Тороповский А.Н.
(И.О.Фамилия)

Принято
28.11.