

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор клинических исследований и
дополнительных сервисов Дирекции
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»



Я.Э. Новикова

20 21 г.

**Инструкция по применению
медицинского изделия для диагностики *in vitro***

**Набор реагентов для выявления мутаций BRCA1-4153delA и BRCA2-6174delT
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени
"Real-time-PCR-BRCA1-4153delA/BRCA2-6174delT"
по ТУ 21.20.23-002-57201404-2019,
производства ООО «Биолинк», Россия**

№ ИНОКИ 670/2020



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БиоЛинк»



Корниенко А.А.

«18» марта 2021 г.

Набор реагентов для выявления мутаций
BRCA1-4153delA и BRCA2-6174delT
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
в режиме реального времени

"Real-time-PCR-BRCA1-4153delA/BRCA2-6174delT"

по ТУ 21.20.23-002-57201404-2019

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Содержание

Содержание	2
Введение	3
1 Назначение набора	3
2 Характеристика набора	4
2.1 Состав набора реагентов	4
2.2 Число анализируемых проб	4
2.3 Принцип действия набора	5
3 Аналитические и диагностические характеристики набора	6
3.1 Предел обнаружения	6
3.2 Аналитическая специфичность	6
3.3 Влияние интерферирующих веществ	6
3.4 Характеристики аналитической эффективности	7
3.5 Диагностическая специфичность	7
3.6 Диагностическая чувствительность	7
4 Меры предосторожности	7
5 Оборудование и материалы	9
5.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов	9
5.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов	10
6 Анализируемые пробы	10
7 Подготовка компонентов для анализа	11
7.1 Подготовка реагентов	11
7.2 Подготовка образцов	11
8 Проведение анализа	11
8.1 Приготовление смесей для ПЦР	11
8.2 Программирование и запуск термоциклера CFX96	14
9 Анализ результатов	15
9.1 Критерии достоверности результатов ПЦР	15
9.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутации BRCA1-4153delA	17
9.3 Анализ результатов ПЦР на наличие мутации BRCA2-6174delT	18
10 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации	20
10.1 Условия хранения	20
10.2 Условия транспортирования	20
10.3 Условия эксплуатации	20
11 Гарантийные обязательства	21
12 Маркировка	21
Библиография	22

Введение

Гены *BRCA1/2* относятся к группе генов-онкосупрессоров. Продукты этих генов участвуют в процессе гомологичной репарации двунитевых разрывов ДНК. Клинически значимые мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* ассоциированы с повышенным риском развития рака молочной железы и яичников у женщин, рака грудной и предстательной железы у мужчин [1-4].

По литературным данным, 5-10% случаев рака молочной железы и 10-20% рака яичников являются наследственными [5-7]. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* объясняют от 20 до 50% всех случаев наследственных новообразований при раке молочной железы [8, 9].

Анализ на наличие мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* показан в рамках программы скрининга и профилактики рака молочной железы с целью выявления наследственной предрасположенности женщинам, у родственников которых был диагностирован рак молочной железы или яичников, или была обнаружена мутация в одном из генов. Обнаружение мутаций у клинически здоровых женщин позволяет провести своевременную диагностику, выявить опухоль на ранних этапах развития, малотравматично удалить её, сохраняя после операции комфортный уровень жизни в течение продолжительного срока [10, 11].

Обнаружение мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* крайне важно и для тех пациентов, у которых диагноз уже установлен, поскольку позволяет более точно определить прогноз заболевания и подобрать более эффективную схему лечения [12].

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения мутаций *BRCA1-4153delA* и *BRCA2-6174delT* методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с целью проведения скрининга для выявления наследственных форм рака молочной железы и/или рака яичников. Материалом для проведения ПЦР является ДНК, выделенная из цельной крови. Для проведения ПЦР используется «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями» исполнения: «C1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (производства Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

2 Характеристика набора

2.1 Состав набора реагентов

Набор содержит пробирки с реагентами (таблица 1), инструкцию по применению и паспорт качества.

Таблица 1. Состав набора реагентов

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объем реагента
1	Зеленый	Смесь праймеров 4153-W ¹	120 мкл
2	Фиолетовый	Смесь праймеров 4153-M ²	120 мкл
3	Зеленый	Смесь праймеров 6174-W ³	120 мкл
4	Фиолетовый	Смесь праймеров 6174-M ⁴	120 мкл
5	Желтый	ПЦР-смесь с Таq ДНК-полимеразой	2 × 960 мкл
6	Красный	ПКО-4153 ⁵	80 мкл
7	Красный	ПКО-6174 ⁶	80 мкл
8	Бесцветный	ОКО ⁷	160 мкл
9	Белый	H ₂ O	4000 мкл

¹) Праймеры для выявления гена *BRCA1* без мутации 4153delA;

²) Праймеры для выявления гена *BRCA1* с мутацией 4153delA в гетерозиготном состоянии;

³) Праймеры для выявления гена *BRCA2* без мутации 6174delT;

⁴) Праймеры для выявления гена *BRCA2* с мутацией 6174delT в гетерозиготном состоянии;

⁵) Положительный контрольный образец, содержащий ампликон с фрагментом гена *BRCA1* с мутацией 4153delA в гетерозиготном состоянии;

⁶) Положительный контрольный образец, содержащий ампликон с фрагментом гена *BRCA2* с мутацией 6174delT в гетерозиготном состоянии;

⁷) Отрицательный контрольный образец, содержащий смесь ампликонов с фрагментами генов *BRCA1* без мутаций и *BRCA2* без мутаций.

Компоненты набора в рабочих концентрациях не токсичны, не обладают канцерогенным и мутагенным действием.

2.2 Число анализируемых проб

Набор реагентов содержит реактивы для проведения 50 реакций, что позволяет проанализировать от 6 клинических образцов с положительным и отрицательным контролем (все образцы в дублях) до 21 клинического образца с положительным и

отрицательным контролем (все образцы в дублях) в зависимости от схемы постановки ПЦР.

2.3 Принцип действия набора

Принцип действия набора реагентов основан на методе аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с детекцией сигнала с помощью TaqMan зондов.

Набор реагентов содержит ПЦР-смесь, состоящую из необходимых реагентов, включая Taq ДНК-полимеразу, и четыре смеси праймеров.

В аллель-специфичной ПЦР происходит избирательная амплификация фрагментов ДНК, содержащих последовательность нуклеотидов, комплементарную праймерам. Продукты ПЦР генов *BRCA1* и *BRCA2* детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM.

Для контроля работы набора в его состав входят положительный контрольный образец ПКО-4153, положительный контрольный образец ПКО-6174 и отрицательный контрольный образец (ОКО).

ПКО-4153 содержит ампликон с фрагментом гена *BRCA1* с мутацией 4153delA в гетерозиготном состоянии, ПКО-6174 содержит ампликон с фрагментом гена *BRCA2* с мутацией 6174delT в гетерозиготном состоянии. ОКО содержит смесь ампликонов с фрагментами генов *BRCA1* и *BRCA2* без мутаций.

При каждой постановке ПЦР используют соответствующий ПКО и ОКО. Все исследуемые и контрольные образцы тестируют в дублях.

Анализ на наличие мутации 4153delA в гене *BRCA1* состоит из двух реакций:

- 1) проверка исследуемых образцов ДНК в ПЦР со смесью праймеров 4153-W (для выявления ДНК гена *BRCA1* без мутации 4153delA);
- 2) проверка исследуемых образцов ДНК в ПЦР со смесью праймеров 4153-M (для выявления ДНК гена *BRCA1* с мутацией 4153delA в гетерозиготном состоянии).

Наличие мутации определяется по разнице между значениями C_t в ПЦР со смесью праймеров 4153-W и в ПЦР со смесью праймеров 4153-M (ΔC_t).

Анализ на наличие мутации 6174delT в гене *BRCA2* состоит из двух реакций:

- 1) проверка исследуемых образцов ДНК в ПЦР со смесью праймеров 6174-W (для выявления ДНК гена *BRCA2* без мутации 6174delT);
- 2) проверка исследуемых образцов ДНК в ПЦР со смесью праймеров 6174-M (для выявления ДНК гена *BRCA2* с мутацией 6174delT в гетерозиготном состоянии).

Наличие мутации определяется по разнице между значениями C_t в ПЦР со смесью праймеров 6174-W и в ПЦР со смесью праймеров 6174-M (ΔC_t).

Образцы учитываются как положительные, то есть содержащие соответствующую мутацию в гетерозиготном состоянии, если значение ΔC_t находится в диапазоне от -2 до 2. Если значение ΔC_t больше 2, образцы учитываются как отрицательные (без мутаций).

В гомозиготном состоянии мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* не встречаются, поскольку это доминантные мутации с высокой степенью пенетрантности.

3 Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения – 1,8 мкг/мл ДНК с мутацией BRCA1-4153delA и 1,8 мкг/мл ДНК с мутацией BRCA2-6174delT.

3.2 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов определяется по отрицательному результату в аллель-специфичной ПЦР с 18000 копий ДНК с фрагментами генов BRCA1 без мутаций и BRCA2 без мутаций, и составляет 100%.

Потенциально интерферирующие мутации в гене *BRCA1*: rs431825404, rs397509129, rs80358340, rs273900712, rs80357727, rs397509130, rs886040188, rs886040184, rs886040183. Потенциально интерферирующие мутации в гене *BRCA2*: rs80359547, rs1555284458, rs1566233523, rs28897738, rs397507814, rs397507813, rs80359549, rs80359551, rs886040621, rs876661236, rs397507817. Поскольку перечисленные мутации обнаруживают крайне редко (частоты встречаемости не определены), влияние этих мутаций не проверяли в экспериментах.

3.3 Влияние интерферирующих веществ

К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец ДНК, относятся следующие вещества: гемоглобин, общий белок крови, триглицериды, билирубин и этиловый спирт, присутствующие в образце ДНК в результате неполного удаления в ходе выделения ДНК из крови.

Интерферирующие вещества не влияют на результаты анализа в следующих концентрациях: альбумин – 51 мг/мл, билирубин – 35,1 мкмоль/л, гемоглобин – 5 мг/мл, триглицериды – 34,23 ммоль/л, этиловый спирт – 100 мкл/мл (5%).

3.4 Характеристики аналитической эффективности

Повторяемость оценивали в условиях, при которых независимые результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, одним оператором, в пределах короткого промежутка времени. По результатам испытаний расхождений в определении мутаций BRCA1-4153delA и BRCA2-6174delT выявлено не было. Значение повторяемости 100% (интервал 96,2-100% с доверительной вероятностью 95%).

Воспроизводимость оценивали в условиях, при которых результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, двумя операторами, с использованием различного оборудования. По результатам испытаний расхождений в определении мутаций BRCA1-4153delA и BRCA2-6174delT выявлено не было. Значение воспроизводимости 100% (интервал 96,8-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.5 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов в клинических испытаниях на выборке из 62 образцов составила 100% (интервал 86,28%-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.6 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов в клинических испытаниях на выборке из 62 образцов составила 100% (интервал 90,51%-100% с доверительной вероятностью 95%).

4 Меры предосторожности

4.1 Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2б согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.

4.2 Набор реагентов предназначен для использования в лабораториях, соответствующих требованиям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3 Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.

- 4.4 Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
- 4.5 Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
- 4.6 Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
- 4.7 При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- 4.8 Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.
- 4.9 При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.
- 4.10 Использовать только ПЦР-смесь с Taq ДНК-полимеразой, входящую в состав набора реагентов.
- 4.11 Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
- 4.12 Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
- 4.13 Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- 4.14 Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно следует подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.
- 4.15 Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
- 4.16 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». **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, реагентов и оборудования.

4.17 Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

5 Оборудование и материалы

5.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Автоматические дозаторы Discovery Comfort переменного объема («HTL», Польша) на 0,2-2 мкл (кат. № DV2), 0,5-10 мкл (кат. № DV10), 2-20 мкл (кат. № DV20), 10-100 мкл (кат. № DV100), 20-200 мкл (кат. № DV200), 100-1000 мкл (кат. № DV1000) или аналогичное оборудование.

Компьютер с операционной системой Windows XP Professional SP3 или Windows 7 и выше, жёстким диском не менее 10 ГБ, тактовой частотой процессора не менее 2.0 ГГц, оперативной памятью не менее 1 ГБ, разрешением экрана не менее 1024*768, программным обеспечением Microsoft Office Excel версии 2003 или выше.

Мини-центрифуга-вортекс «Микроспин» FV-2400 («SIA BIOSAN», кат. № BS-010201-AAA, Латвия) с ротором R-1.5M для пробирок (кат. № BS-010201-AK) и ротором SR-64 для стрипов (кат. № BS-010201-EK) или аналогичное оборудование.

ПЦР-бокс 2-го класса биологической защиты для работы с ДНК (например, БАВ-ПЦР-Ламинар-С, ЗАО «Ламинарные системы», Россия) или аналогичное оборудование.

Термостат твердотельный М-208 с диапазоном температур от комнатной до 99°C («БИС-Н», Россия) или аналогичное оборудование.

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнения: «C1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (производства Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Холодильник бытовой с холодильной (от 2°C до 8°C) и морозильной камерами (от минус 18°C до минус 25°C) (например, ATLANT XM-6023-031 «ATLANT», Белоруссия).

Центрифуга медицинская лабораторная BioSan LMC-300 («SIA BIOSAN», кат. № BS-010208-AAA, Латвия) с ротором R-2 (кат. № BS-010208-AK) и адаптерами для 96-луночных ПЦР-планшетов (кат. № BS-010219-DK) или аналогичное оборудование.

5.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

96-луночный штатив для микропробирок 0,5-2,0 мл («компания Хеликон», кат. № RP-80, Россия или аналогичные).

Контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария –ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия или аналогичный).

Микроцентрифужные пробирки («Ахуген», США) градуированные объемом 0,6 мл (кат. № МСТ-060-С) и 1,5 мл (кат. № МСТ-150-С) или аналогичные.

Набор реагентов для выделения ДНК из образцов цельной крови, например, «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов (РеалБест экстракция 100) по ТУ 9398-464-23548172-2013», производства АО «Вектор-Бест» (ФСР 2010/08696 от 25 октября 2016 г.).

Наконечники универсальные для дозаторов («Ахуген», США) с фильтром объемом 0,5-10 мкл (кат. № TF-300), 20 мкл (кат. № TF-20), 200 мкл (кат. № TF-200) и 1000 мкл (кат. № TF-1000) или аналогичные.

Перчатки медицинские одноразовые неопудренные нитриловые или латексные («Benovy», Малайзия или аналогичные).

Стрипы по 8 пробирок объемом 0,2 мл с крышками («BIOplastics», кат. № K72810B или аналогичные).

Штатив для пробирок объемом 1,5 мл (например, фирма «SSI», США или аналогичный).

6 Анализируемые пробы

В качестве материала для проведения ПЦР используют клинические образцы ДНК, выделенные из цельной периферической крови пациентов. В набор не входят реагенты для выделения ДНК. Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к набору для выделения ДНК из крови.

ВНИМАНИЕ! Образцы крови хранить до момента выделения ДНК при температуре от 2 °С до 8 °С не более 48 часов. Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта!

7 Подготовка компонентов для анализа

7.1 Подготовка реагентов

Все компоненты набора реагентов разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C, убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 1-2 сек при 1000 об/мин., чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок. Не использовать вортекс для ПЦР-смеси с Taq ДНК-полимеразой, это может привести к инактивации фермента.

ВНИМАНИЕ! После приготовления смесей для ПЦР немедленно поместить оставшиеся реагенты в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

ВНИМАНИЕ! Помимо клинических образцов ДНК в каждой постановке необходимо использовать ПКО, ОКО и H₂O, входящие в состав набора реагентов, все образцы тестировать в дублях.

7.2 Подготовка образцов

Выделение ДНК провести с помощью набора реагентов, предназначенного для выделения ДНК из образцов цельной крови, в соответствии с инструкцией по его применению, например, «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов (РеалБест экстракция 100) по ТУ 9398-464-23548172-2013», производства АО «Вектор-Бест» (ФСР 2010/08696 от 25 октября 2016 г.).

8 Проведение анализа

8.1 Приготовление смесей для ПЦР

8.1.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смеси с Taq ДНК-полимеразой и смесей праймеров с учётом погрешности при пипетировании. Состав реакционной смеси на одну реакцию приведен в таблице 2, для тестирования N клинических образцов ДНК в дублях указанное количество необходимо умножить на (2N + 7).

Таблица 2. Количество реагентов на одну реакцию

Реагент	Количество, мкл			
ПЦР-смесь с Taq ДНК-полимеразой	8	8	8	8
Смесь праймеров 4153-W	2	—	—	—
Смесь праймеров 4153-M	—	2	—	—
Смесь праймеров 6174-W	—	—	2	—
Смесь праймеров 6174-M	—	—	—	2
H ₂ O	12	12	12	12

ВНИМАНИЕ! Протоколы анализа на наличие мутаций BRCA1-4153delA и BRCA2-6174delT различаются. Если в распоряжении пользователя имеется два термоциклера для амплификации, анализ проводят параллельно. При наличии одного прибора анализ на разные мутации проводят последовательно.

8.1.2 Приготовить и промаркировать 4 пробирки объемом 1,5 мл:

- «4153-W» (для реакционной смеси, содержащей праймеры 4153-W),
- «4153-M» (для реакционной смеси, содержащей праймеры 4153-M),
- «6174-W» (для реакционной смеси, содержащей праймеры 6174-W),
- «6174-M» (для реакционной смеси, содержащей праймеры 6174-M).

8.1.3 Приготовить четыре реакционные смеси в пробирках объемом 1,5 мл согласно расчёту (пункт 8.1.1): внести в каждую пробирку расчётное количество ПЦР-смеси с Taq ДНК-полимеразой (пробирка №5, жёлтая крышка), воды (пробирка №8, белая крышка) и добавить соответствующую смесь праймеров (пробирки №1-№4 с фиолетовыми и зелёными крышками) и тщательно перемешать пипетированием (не использовать вортекс). Реакционные смеси готовы.

ВНИМАНИЕ! Использовать ПЦР-смесь немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходной ПЦР-смеси с Taq ДНК-полимеразой и праймеров сразу поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

8.1.4 Подготовить и промаркировать стрипы. **ВНИМАНИЕ!** Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать стрипы на крышках!

Пример расположения образцов при анализе пяти образцов ДНК на наличие мутации BRCA1-4153delA приведен на рисунке 1.

Смесь	Клинические образцы ДНК					Образцы из набора		
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО	ОКО	H ₂ O
4153-W	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО-4153	ОКО	H ₂ O
	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W
4153-M	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО-4153	ОКО	H ₂ O
	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M
4153-M	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО-4153	ОКО	H ₂ O
	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M

Рисунок 1. Схема расположения пяти образцов ДНК в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок. Указаны номера образцов ДНК, ПКО, ОКО, H₂O и название ПЦР-смесей.

Пример расположения образцов при анализе пяти образцов ДНК на наличие мутации BRCA2-6174delT приведен на рисунке 2.

Смесь	Клинические образцы ДНК					Образцы из набора		
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО	ОКО	H ₂ O
6174-W	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО-6174	ОКО	H ₂ O
	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W
6174-M	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО-6174	ОКО	H ₂ O
	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M
6174-M	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО-6174	ОКО	H ₂ O
	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M

Рисунок 2. Схема расположения пяти образцов ДНК в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок. Указаны номера образцов ДНК, ПКО, ОКО, H₂O и название ПЦР-смесей.

8.1.5 Добавить в пробирки по 22 мкл готовых реакционных смесей «4153-W», «4153-M», «6174-W», «6174-M» и закрыть крышки.

8.1.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

- по 3 мкл воды в пробирки для воды;
- по 3 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;
- по 3 мкл ДНК клинических образцов в соответствующие пробирки;
- по 3 мкл ПКО-4153 или ПКО-6174 в пробирки для положительного контроля.

Каждую пробирку открывать перед добавлением образца и закрывать сразу после добавления.

8.1.7 Легко перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

8.1.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

8.1.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

8.2 Программирование и запуск термоциклера CFX96

8.2.1 Запрограммировать термоциклер для проведения ПЦР и детекции флуоресценции в соответствии с руководством по эксплуатации и п. 8.2.2-8.2.4.

8.2.2 Задать объем реакционной смеси 25 мкл. Запрограммировать протокол проведения ПЦР в соответствии с таблицей 3 для мутации BRCA1-4153delA и в соответствии с таблицей 4 для мутации BRCA2-6174delT.

Таблица 3. Протокол ПЦР в реальном времени для определения мутации BRCA1-4153delA

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	3 мин	Нет
10	Денатурация	95°C	10 сек	
	Отжиг праймеров	60°C	1 мин	
30	Денатурация	95°C	10 сек	Да
	Отжиг праймеров	60°C	55 сек	

Таблица 4. Протокол ПЦР в реальном времени для определения мутации BRCA2-6174delT

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	3 мин	Нет
10	Денатурация	95°C	10 сек	
	Отжиг праймеров	64°C	1 мин	
30	Денатурация	95°C	10 сек	Да
	Отжиг праймеров	64°C	55 сек	

8.2.3 Выбрать канал FAM для регистрации флуоресценции.

8.2.4 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

8.2.5 Запустить протокол ПЦР.

9 Анализ результатов

9.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

9.1.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для каждого образца определить значение порогового цикла (Ct) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает пороговый уровень (threshold level). Для получения величин Ct выставить вручную значение порогового уровня 100.

9.1.2 Проверить значения Ct по каналу FAM последовательно для H₂O, ОКО, ПКО-4153 или ПКО-6174 и клинических образцов ДНК.

9.1.3 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций BRCA1-4153delA и BRCA2-6174delT только в том случае, если величины Ct для H₂O, ОКО, ПКО-4153 или ПКО-6174 имеют допустимые значения (таблица 5):

- для H₂O во всех реакциях не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение Ct или определяется значение Ct больше либо равно 28;

- для ПКО-4153 в реакциях со смесями праймеров 4153-W и 4153-M наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение Ct меньше или равно 25;

- для ПКО-6174 в реакциях со смесями праймеров 6174-W и 6174-M наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение Ct меньше или равно 25;

- для ОКО в реакциях со смесями праймеров 4153-W и 6174-W наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение Ct меньше или равно 25 (далее обозначены как Ct_{4153-W} и Ct_{6174-W} соответственно);

- для ОКО в реакции со смесью праймеров 4153-M определяется значение Ct_{4153-M} больше либо равно (Ct_{4153-W}+2) и в реакции со смесью праймеров 6174-M определяется значение Ct_{6174-M} больше либо равно (Ct_{6174-W}+2).

Таблица 5. Допустимые значения Ct для H₂O, ОКО, ПКО-4153, ПКО-6174

Образец	Значение Ct в ПЦР со смесью		Результат
	4153-W и 6174-W	4153-M и 6174-M	
H ₂ O	Ct не определено или Ct ≥ 28		Валидный
ПКО-4153, ПКО-6174	Ct ≤ 25	Ct ≤ 25	Валидный
ОКО	Ct ≤ 25	Ct _{4153-M} ≥ Ct _{4153-W} + 2 ¹⁾ Ct _{6174-M} ≥ Ct _{6174-W} + 2 ²⁾	Валидный

¹⁾ Ct_{4153-M} – Ct ОКО в реакции со смесью праймеров 4153-M.

Ct_{4153-W} – Ct ОКО в реакции со смесью праймеров 4153-W.

²⁾ Ct_{6174-M} – Ct ОКО в реакции со смесью праймеров 6174-M.

Ct_{6174-W} – Ct ОКО в реакции со смесью праймеров 6174-W.

9.1.4 Если величины Ct контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если после повторного анализа значения Ct не соответствуют допустимым пределам, то результаты анализа не валидны. Возможные проблемы представлены в таблице 6.

Таблица 6. Другие возможные значения Ct и возможные проблемы

Образец	Значение Ct в ПЦР со смесью		Возможные проблемы
	4153-W и 6174-W	4153-M и 6174-M	
H ₂ O	Ct < 28		Возможна контаминация.
ПКО-4153, ПКО-6174	Ct > 25		Возможны ошибки при постановке, деградация ПЦР смеси и/или ПКО.
ОКО		Ct _{4153-M} < Ct _{4153-W} + 2 ²⁾ Ct _{6174-M} < Ct _{6174-W} + 2 ³⁾	Возможна контаминация.
	Ct > 25		Возможны ошибки при постановке, деградация ПЦР смеси и/или ОКО.

9.1.5 Для каждого клинического образца в реакции со смесью праймеров 4153-W и со смесью праймеров 6174-W должно наблюдаться нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяться значение Ct меньше или равно 25. Если для образца значение Ct не определено или больше 25, то концентрация ДНК недостаточна для анализа, для этого образца расчёт ΔCt не проводится.

9.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутации BRCA1-4153delA

9.2.1 Если для клинического образца в реакции со смесью праймеров 4153-M значение C_t не определено, задать его равным 36.

9.2.2 Для каждого клинического образца рассчитать разницу $\Delta C_t = C_{t4153-M} - C_{t4153-W}$, где $C_{t4153-M}$ – среднее для двух дублей значение C_t образца в ПЦР со смесью праймеров 4153-M, $C_{t4153-W}$ – среднее для двух дублей значение C_t того же образца в ПЦР со смесью праймеров 4153-W.

9.2.3 Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию 4153delA в гене BRCA1 в гетерозиготном состоянии), если значение ΔC_t находится в диапазоне от -2 до 2 (рисунок 2А).

9.2.4 Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию 4153delA в гене BRCA1), если значение ΔC_t больше 2 (рисунок 2Б).

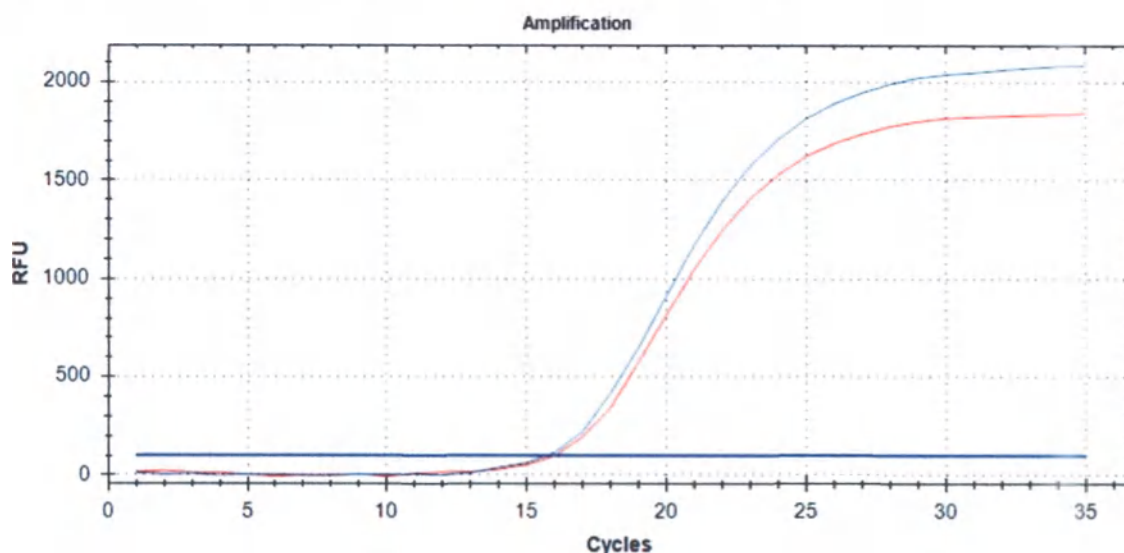


Рисунок 2. Примеры кривых флуоресценции в относительных единицах (RFU) в ПЦР со смесью праймеров 4153-W (синие линии) и в аллель-специфичной ПЦР со смесью праймеров 4153-M (красные линии)
А – образец, содержащий 10 нг ДНК с мутацией 4153delA в гене BRCA1

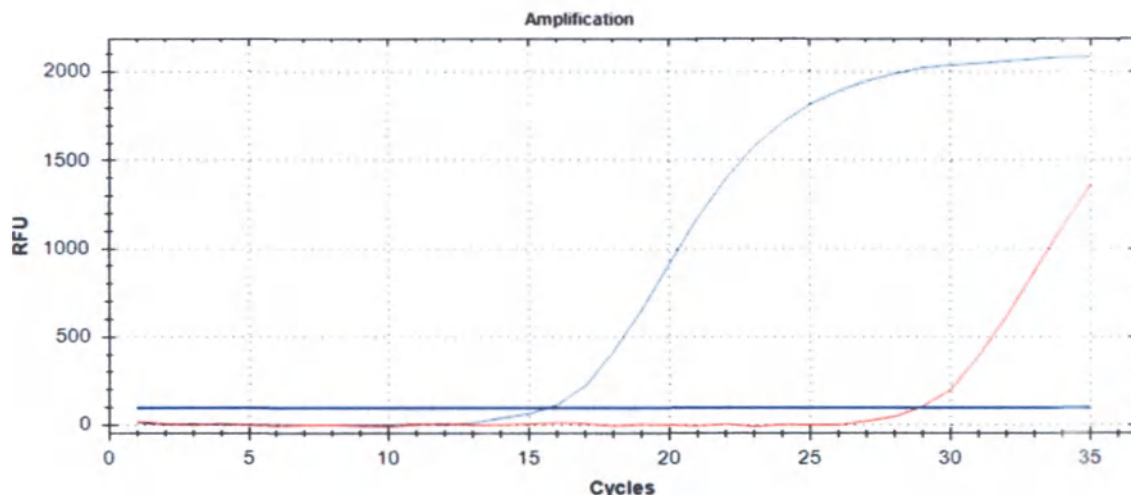


Рисунок 2. Примеры кривых флуоресценции в относительных единицах (RFU) в ПЦР со смесью праймеров 4153-W (синие линии) и в аллель-специфичной ПЦР со смесью праймеров 4153-M (красные линии)
Б – образец, содержащий 10 нг ДНК без мутации 4153delA в гене BRCA1

9.3 Анализ результатов ПЦР на наличие мутации BRCA2-6174delT

9.3.1 Если для клинического образца в реакции со смесью праймеров 6174-M значение C_t не определено, задать его равным 36.

9.3.2 Для каждого клинического образца рассчитать разницу $\Delta C_t = C_{t6174-M} - C_{t6174-W}$, где $C_{t6174-M}$ – среднее для двух дублей значение C_t образца в ПЦР со смесью праймеров 6174-M, $C_{t6174-W}$ – среднее для двух дублей значение C_t того же образца в ПЦР со смесью праймеров 6174-W.

9.3.3 Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию 6174delT в гене BRCA2 в гетерозиготном состоянии), если значение ΔC_t находится в диапазоне от -2 до 2 (рисунок 3А).

9.3.4 Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию 6174delT в гене BRCA2), если значение ΔC_t больше 2 (рисунок 3Б).

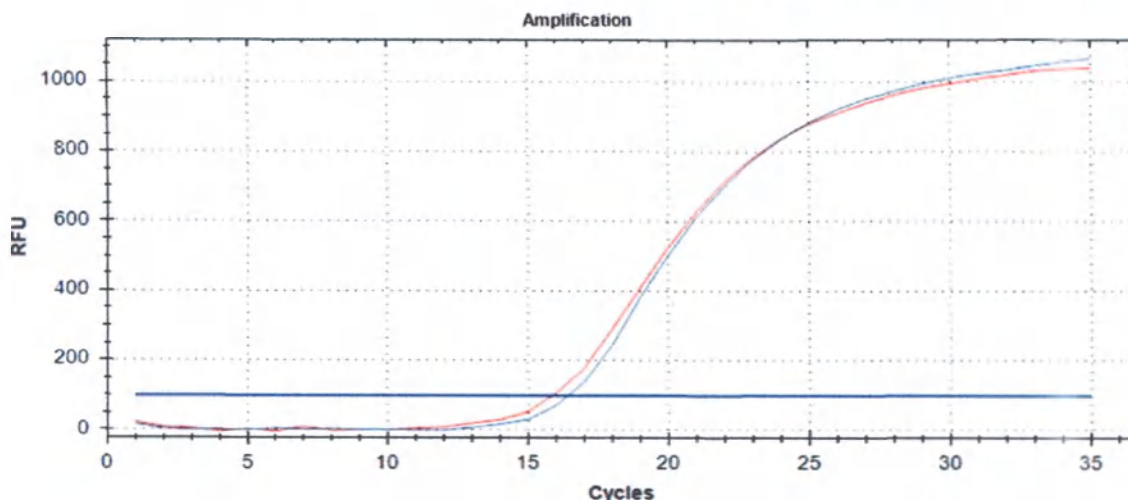


Рисунок 3. Примеры кривых флуоресценции в относительных единицах (RFU) в ПЦР со смесью праймеров 6174-W (синие линии) и в аллель-специфичной ПЦР со смесью праймеров 6174-M (красные линии).

А – образец, содержащий 10 нг ДНК с мутацией 6174delT в гене BRCA2

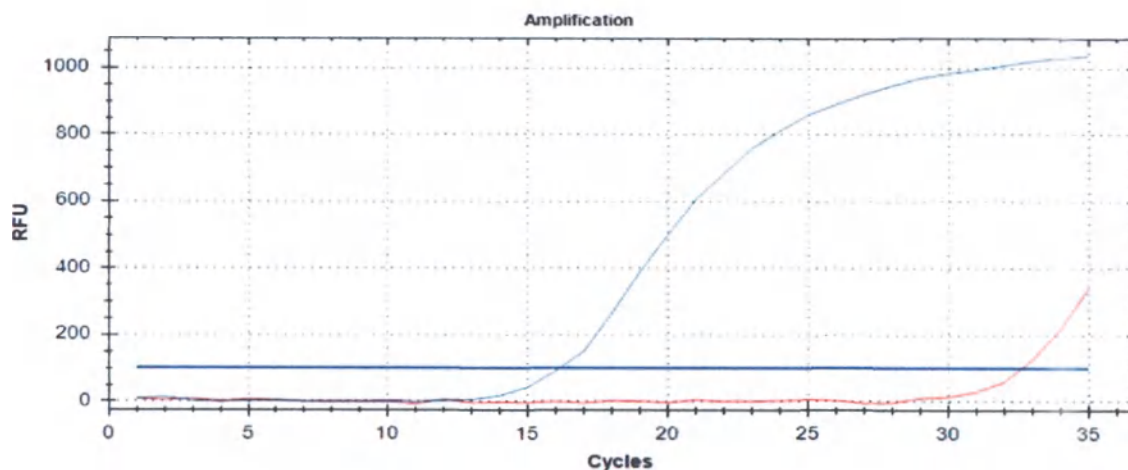


Рисунок 3. Примеры кривых флуоресценции в относительных единицах (RFU) в ПЦР со смесью праймеров 6174-W (синие линии) и в аллель-специфичной ПЦР со смесью праймеров 6174-M (красные линии).

Б – образец, содержащий 10 нг ДНК без мутации 6174delT в гене BRCA2

10 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации

10.1 Условия хранения

10.1.1 Хранить набор реагентов при температуре от минус 18°C до минус 25°C в течение всего срока годности в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, не допуская проникновения света.

10.1.2 Не подвергать набор реагентов замораживанию и размораживанию более трёх раз, общее время нахождения после оттаивания при температуре 22°C – не более 30 минут.

10.1.3 Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска или 3 месяца после первого вскрытия упаковки набора в зависимости от того, какая дата наступит раньше.

10.2 Условия транспортирования

10.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре не выше минус 18°C.

10.2.2 Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы (ХТЛ-4, ООО «Термологика» или аналогичные).

10.2.3 Срок транспортирования – не более 5 суток.

10.2.4 При транспортировании необходимо соблюдать условия, обеспечивающие сохранность набора реагентов от механического повреждения, неблагоприятного воздействия температуры окружающей среды, воздействия солнечного света.

ВНИМАНИЕ! Если реагенты прибыли незамороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «БиоЛинк» (см. раздел 11).

10.3 Условия эксплуатации

10.3.1 Использовать набор реагентов при комнатной температуре (от 18°C до 25°C).

10.3.2 Строго соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

10.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

11 Гарантийные обязательства

11.1 Производитель гарантирует соответствие качества набора реагентов требованиям нормативной и технической документации при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2 Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действий третьих лиц, либо обстоятельств непреодолимой силы.

11.3 В случае нарушения условий транспортирования, обнаружения повреждений упаковки, а также по вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обратиться к производителю ООО «БиоЛинк».

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13
Телефон: +7 (383) 209-32-40
Электронная почта: info@biolinklab.ru
Веб-сайт: biolinklab.ru

12 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Не допускать воздействия солнечного света		Дата изготовления (месяц, год)
	Обратитесь к инструкции по применению		Использовать до (месяц, год)
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Изготовитель

Библиография

1. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21 / J. M. Hall, M. K. Lee, B. Newman et al. // Science. – 1990. – V. 250 (4988). – P. 1684-1689.
2. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 / R. Wooster, G. Bignell, J. Lancaster et al. // Nature. – 1995. – V. 378 (6559). – P. 789-792.
3. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13 / R. Wooster, S. L. Neuhausen, J. Mangion et al. // Science. – 1994. – V. 265 (5181). – P. 2088-2090.
4. Associations of high-grade prostate cancer with BRCA1 and BRCA2 founder mutations / I. Agalliu, R. Gern, S. Leanza, R. Burk // Clin. Cancer Res. – 2009. – V. 15 (3). – P. 1112-1120.
5. Association between common variation in 120 candidate genes and breast cancer risk / P. D. Pharoah, J. Tyrer, A. M. Dunning et al. // PLoS Genet. – 2007. – № 3. – P. 42.
6. Genetic susceptibility to breast cancer / N. Mavaddat, A. C. Antoniou, D. F. Easton, M. Garcia-Closas // Mol. Oncol. – 2010. – № 4 (3). – P. 174-191.
7. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment / N. Lalwani, S. R. Prasad, R. Vikram et al. // Radiographics. – 2011. – V. 31. – P. 625-646.
8. Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies / A. Antoniou, P. D. Pharoah, S. Narod et al. // J. Med. Genet. – 2005. – № 42 (7). – P. 602-603.
9. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. / C. Turnbull, N. Rahman – 2008. – V. 9. – P. 321-345.
10. German consortium for hereditary breast and ovarian cancer. Evaluating the performance of the breast cancer genetic risk models BOADICEA, IBIS, BRCAPRO and Claus for predicting BRCA1/2 mutation carrier probabilities: a study based on 7352 families from the German Hereditary Breast and Ovarian Cancer Consortium / C. Fischer, K. Kuchenbäcker, C. Engel et al. // J. Med. Genet. – 2013. – № 50 (6). – P. 360-367.
11. Выявление мутаций, связанных с наследственными формами рака, у родственников больных раком молочной железы / Г. А. Пауль, Н. А. Матяш, Е. Е. Писарева и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2017. – Т. 16. № 4. – С. 84-88.
12. Особенности лечения пациентов с наследственными опухолями / В. М. Моисеенко, Н. М. Волков // Практическая онкология. – 2014. – Т. 15. № 3. – С. 118-125.



Производитель: ООО «БиоЛинк»

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: (383) 209-32-40, 382-99-07

E-mail: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru



23 (двадцать три) листов
Директор ООО «БиоЛинк»
/ Корниенко А. А. /

Прошито в количестве 24 листов
«16» марта 2021 года
Директор клинических исследований и
дополнительных сервисов Дирекции
ООО «Независима лаборатория ИНВИТРО»

Я. Э. Новикова





УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БиоЛинк»

Корниенко А.А.

«18» марта 2021 г.



Набор реагентов для выявления мутаций
BRCA1-4153delA и BRCA2-6174delT
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
в режиме реального времени

"Real-time-PCR-BRCA1-4153delA/BRCA2-6174delT"

по ТУ 21.20.23-002-57201404-2019

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Содержание

Содержание	2
Введение	3
1 Назначение набора	3
2 Характеристика набора	4
2.1 Состав набора реагентов	4
2.2 Число анализируемых проб	4
2.3 Принцип действия набора	5
3 Аналитические и диагностические характеристики набора	6
3.1 Предел обнаружения	6
3.2 Аналитическая специфичность	6
3.3 Влияние интерферирующих веществ	6
3.4 Характеристики аналитической эффективности	7
3.5 Диагностическая специфичность	7
3.6 Диагностическая чувствительность	7
4 Меры предосторожности	7
5 Оборудование и материалы	9
5.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов	9
5.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов	10
6 Анализируемые пробы	10
7 Подготовка компонентов для анализа	11
7.1 Подготовка реагентов	11
7.2 Подготовка образцов	11
8 Проведение анализа	11
8.1 Приготовление смесей для ПЦР	11
8.2 Программирование и запуск термоциклера CFX96	14
9 Анализ результатов	15
9.1 Критерии достоверности результатов ПЦР	15
9.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутации BRCA1-4153delA	17
9.3 Анализ результатов ПЦР на наличие мутации BRCA2-6174delT	18
10 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации	20
10.1 Условия хранения	20
10.2 Условия транспортирования	20
10.3 Условия эксплуатации	20
11 Гарантийные обязательства	21
12 Маркировка	21
Библиография	22

Введение

Гены *BRCA1/2* относятся к группе генов-онкосупрессоров. Продукты этих генов участвуют в процессе гомологичной репарации двунитевых разрывов ДНК. Клинически значимые мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* ассоциированы с повышенным риском развития рака молочной железы и яичников у женщин, рака грудной и предстательной железы у мужчин [1-4].

По литературным данным, 5-10% случаев рака молочной железы и 10-20% рака яичников являются наследственными [5-7]. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* объясняют от 20 до 50% всех случаев наследственных новообразований при раке молочной железы [8, 9].

Анализ на наличие мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* показан в рамках программы скрининга и профилактики рака молочной железы с целью выявления наследственной предрасположенности женщинам, у родственников которых был диагностирован рак молочной железы или яичников, или была обнаружена мутация в одном из генов. Обнаружение мутаций у клинически здоровых женщин позволяет провести своевременную диагностику, выявить опухоль на ранних этапах развития, малотравматично удалить её, сохраняя после операции комфортный уровень жизни в течение продолжительного срока [10, 11].

Обнаружение мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* крайне важно и для тех пациентов, у которых диагноз уже установлен, поскольку позволяет более точно определить прогноз заболевания и подобрать более эффективную схему лечения [12].

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения мутаций *BRCA1-4153delA* и *BRCA2-6174delT* методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с целью проведения скрининга для выявления наследственных форм рака молочной железы и/или рака яичников. Материалом для проведения ПЦР является ДНК, выделенная из цельной крови. Для проведения ПЦР используется «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями» исполнения: «C1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (производства Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

2 Характеристика набора

2.1 Состав набора реагентов

Набор содержит пробирки с реагентами (таблица 1), инструкцию по применению и паспорт качества.

Таблица 1. Состав набора реагентов

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объем реагента
1	Зеленый	Смесь праймеров 4153-W ¹	120 мкл
2	Фиолетовый	Смесь праймеров 4153-M ²	120 мкл
3	Зеленый	Смесь праймеров 6174-W ³	120 мкл
4	Фиолетовый	Смесь праймеров 6174-M ⁴	120 мкл
5	Желтый	ПЦР-смесь с Taq ДНК-полимеразой	2 × 960 мкл
6	Красный	ПКО-4153 ⁵	80 мкл
7	Красный	ПКО-6174 ⁶	80 мкл
8	Бесцветный	ОКО ⁷	160 мкл
9	Белый	H ₂ O	4000 мкл

¹) Праймеры для выявления гена *BRCA1* без мутации 4153delA;

²) Праймеры для выявления гена *BRCA1* с мутацией 4153delA в гетерозиготном состоянии;

³) Праймеры для выявления гена *BRCA2* без мутации 6174delT;

⁴) Праймеры для выявления гена *BRCA2* с мутацией 6174delT в гетерозиготном состоянии;

⁵) Положительный контрольный образец, содержащий ампликон с фрагментом гена *BRCA1* с мутацией 4153delA в гетерозиготном состоянии;

⁶) Положительный контрольный образец, содержащий ампликон с фрагментом гена *BRCA2* с мутацией 6174delT в гетерозиготном состоянии;

⁷) Отрицательный контрольный образец, содержащий смесь ампликонов с фрагментами генов *BRCA1* без мутаций и *BRCA2* без мутаций.

Компоненты набора в рабочих концентрациях не токсичны, не обладают канцерогенным и мутагенным действием.

2.2 Число анализируемых проб

Набор реагентов содержит реактивы для проведения 50 реакций, что позволяет проанализировать от 6 клинических образцов с положительным и отрицательным контролем (все образцы в дублях) до 21 клинического образца с положительным и

отрицательным контролем (все образцы в дублях) в зависимости от схемы постановки ПЦР.

2.3 Принцип действия набора

Принцип действия набора реагентов основан на методе аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с детекцией сигнала с помощью TaqMan зондов.

Набор реагентов содержит ПЦР-смесь, состоящую из необходимых реагентов, включая Taq ДНК-полимеразу, и четыре смеси праймеров.

В аллель-специфичной ПЦР происходит избирательная амплификация фрагментов ДНК, содержащих последовательность нуклеотидов, комплементарную праймерам. Продукты ПЦР генов *BRCA1* и *BRCA2* детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM.

Для контроля работы набора в его состав входят положительный контрольный образец ПКО-4153, положительный контрольный образец ПКО-6174 и отрицательный контрольный образец (ОКО).

ПКО-4153 содержит ампликон с фрагментом гена *BRCA1* с мутацией 4153delA в гетерозиготном состоянии, ПКО-6174 содержит ампликон с фрагментом гена *BRCA2* с мутацией 6174delT в гетерозиготном состоянии. ОКО содержит смесь ампликонов с фрагментами генов *BRCA1* и *BRCA2* без мутаций.

При каждой постановке ПЦР используют соответствующий ПКО и ОКО. Все исследуемые и контрольные образцы тестируют в дублях.

Анализ на наличие мутации 4153delA в гене *BRCA1* состоит из двух реакций:

- 1) проверка исследуемых образцов ДНК в ПЦР со смесью праймеров 4153-W (для выявления ДНК гена *BRCA1* без мутации 4153delA);
- 2) проверка исследуемых образцов ДНК в ПЦР со смесью праймеров 4153-M (для выявления ДНК гена *BRCA1* с мутацией 4153delA в гетерозиготном состоянии).

Наличие мутации определяется по разнице между значениями Ct в ПЦР со смесью праймеров 4153-W и в ПЦР со смесью праймеров 4153-M (ΔCt).

Анализ на наличие мутации 6174delT в гене *BRCA2* состоит из двух реакций:

- 1) проверка исследуемых образцов ДНК в ПЦР со смесью праймеров 6174-W (для выявления ДНК гена *BRCA2* без мутации 6174delT);
- 2) проверка исследуемых образцов ДНК в ПЦР со смесью праймеров 6174-M (для выявления ДНК гена *BRCA2* с мутацией 6174delT в гетерозиготном состоянии).

Наличие мутации определяется по разнице между значениями C_t в ПЦР со смесью праймеров 6174-W и в ПЦР со смесью праймеров 6174-M (ΔC_t).

Образцы учитываются как положительные, то есть содержащие соответствующую мутацию в гетерозиготном состоянии, если значение ΔC_t находится в диапазоне от -2 до 2. Если значение ΔC_t больше 2, образцы учитываются как отрицательные (без мутаций).

В гомозиготном состоянии мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* не встречаются, поскольку это доминантные мутации с высокой степенью пенетрантности.

3 Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения – 1,8 мкг/мл ДНК с мутацией BRCA1-4153delA и 1,8 мкг/мл ДНК с мутацией BRCA2-6174delT.

3.2 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов определяется по отрицательному результату в аллель-специфичной ПЦР с 18000 копий ДНК с фрагментами генов BRCA1 без мутаций и BRCA2 без мутаций, и составляет 100%.

Потенциально интерферирующие мутации в гене *BRCA1*: rs431825404, rs397509129, rs80358340, rs273900712, rs80357727, rs397509130, rs886040188, rs886040184, rs886040183. Потенциально интерферирующие мутации в гене *BRCA2*: rs80359547, rs1555284458, rs1566233523, rs28897738, rs397507814, rs397507813, rs80359549, rs80359551, rs886040621, rs876661236, rs397507817. Поскольку перечисленные мутации обнаруживают крайне редко (частоты встречаемости не определены), влияние этих мутаций не проверяли в экспериментах.

3.3 Влияние интерферирующих веществ

К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец ДНК, относятся следующие вещества: гемоглобин, общий белок крови, триглицериды, билирубин и этиловый спирт, присутствующие в образце ДНК в результате неполного удаления в ходе выделения ДНК из крови.

Интерферирующие вещества не влияют на результаты анализа в следующих концентрациях: альбумин – 51 мг/мл, билирубин – 35,1 мкмоль/л, гемоглобин – 5 мг/мл, триглицериды – 34,23 ммоль/л, этиловый спирт – 100 мкл/мл (5%).

3.4 Характеристики аналитической эффективности

Повторяемость оценивали в условиях, при которых независимые результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, одним оператором, в пределах короткого промежутка времени. По результатам испытаний расхождений в определении мутаций BRCA1-4153delA и BRCA2-6174delT выявлено не было. Значение повторяемости 100% (интервал 96,2-100% с доверительной вероятностью 95%).

Воспроизводимость оценивали в условиях, при которых результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, двумя операторами, с использованием различного оборудования. По результатам испытаний расхождений в определении мутаций BRCA1-4153delA и BRCA2-6174delT выявлено не было. Значение воспроизводимости 100% (интервал 96,8-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.5 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов в клинических испытаниях на выборке из 62 образцов составила 100% (интервал 86,28%-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.6 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов в клинических испытаниях на выборке из 62 образцов составила 100% (интервал 90,51%-100% с доверительной вероятностью 95%).

4 Меры предосторожности

4.1 Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2б согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.

4.2 Набор реагентов предназначен для использования в лабораториях, соответствующих требованиям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3 Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

- 4.4 Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
- 4.5 Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
- 4.6 Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
- 4.7 При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- 4.8 Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.
- 4.9 При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.
- 4.10 Использовать только ПЦР-смесь с Taq ДНК-полимеразой, входящую в состав набора реагентов.
- 4.11 Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
- 4.12 Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
- 4.13 Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- 4.14 Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно следует подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.
- 4.15 Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
- 4.16 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». **ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после

- 4.4 Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
- 4.5 Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
- 4.6 Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
- 4.7 При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- 4.8 Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.
- 4.9 При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.
- 4.10 Использовать только ПЦР-смесь с Taq ДНК-полимеразой, входящую в состав набора реагентов.
- 4.11 Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
- 4.12 Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
- 4.13 Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- 4.14 Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно следует подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.
- 4.15 Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
- 4.16 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». **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, реагентов и оборудования.

4.17 Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

5 Оборудование и материалы

5.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Автоматические дозаторы Discovery Comfort переменного объема («HTL», Польша) на 0,2-2 мкл (кат. № DV2), 0,5-10 мкл (кат. № DV10), 2-20 мкл (кат. № DV20), 10-100 мкл (кат. № DV100), 20-200 мкл (кат. № DV200), 100-1000 мкл (кат. № DV1000) или аналогичное оборудование.

Компьютер с операционной системой Windows XP Professional SP3 или Windows 7 и выше, жёстким диском не менее 10 ГБ, тактовой частотой процессора не менее 2.0 ГГц, оперативной памятью не менее 1 ГБ, разрешением экрана не менее 1024*768, программным обеспечением Microsoft Office Excel версии 2003 или выше.

Мини-центрифуга-вортекс «Микроспин» FV-2400 («SIA BIOSAN», кат. № BS-010201-AAA, Латвия) с ротором R-1.5M для пробирок (кат. № BS-010201-AK) и ротором SR-64 для стрипов (кат. № BS-010201-EK) или аналогичное оборудование.

ПЦР-бокс 2-го класса биологической защиты для работы с ДНК (например, БАВ-ПЦР-Ламинар-С, ЗАО «Ламинарные системы», Россия) или аналогичное оборудование.

Термостат твердотельный М-208 с диапазоном температур от комнатной до 99°C («БИС-Н», Россия) или аналогичное оборудование.

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнения: «C1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (производства Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Холодильник бытовой с холодильной (от 2°C до 8°C) и морозильной камерами (от минус 18°C до минус 25°C) (например, ATLANT XM-6023-031 «ATLANT», Белоруссия).

Центрифуга медицинская лабораторная BioSan LMC-300 («SIA BIOSAN», кат. № BS-010208-AAA, Латвия) с ротором R-2 (кат. № BS-010208-AK) и адаптерами для 96-луночных ПЦР-планшетов (кат. № BS-010219-DK) или аналогичное оборудование.

5.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

96-луночный штатив для микропробирок 0,5-2,0 мл («компания Хеликон», кат. № RP-80, Россия или аналогичные).

Контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария -ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия или аналогичный).

Микроцентрифужные пробирки («Ахуген», США) градуированные объемом 0,6 мл (кат. № МСТ-060-С) и 1,5 мл (кат. № МСТ-150-С) или аналогичные.

Набор реагентов для выделения ДНК из образцов цельной крови, например, «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов (РеалБест экстракция 100) по ТУ 9398-464-23548172-2013», производства АО «Вектор-Бест» (ФСР 2010/08696 от 25 октября 2016 г.).

Наконечники универсальные для дозаторов («Ахуген», США) с фильтром объемом 0,5-10 мкл (кат. № TF-300), 20 мкл (кат. № TF-20), 200 мкл (кат. № TF-200) и 1000 мкл (кат. № TF-1000) или аналогичные.

Перчатки медицинские одноразовые неопудренные нитриловые или латексные («Benovy», Малайзия или аналогичные).

Стрипы по 8 пробирок объемом 0,2 мл с крышками («BIOplastics», кат. № K72810B или аналогичные).

Штатив для пробирок объемом 1,5 мл (например, фирма «SSI», США или аналогичный).

6 Анализируемые пробы

В качестве материала для проведения ПЦР используют клинические образцы ДНК, выделенные из цельной периферической крови пациентов. В набор не входят реагенты для выделения ДНК. Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к набору для выделения ДНК из крови.

ВНИМАНИЕ! Образцы крови хранить до момента выделения ДНК при температуре от 2 °С до 8°С не более 48 часов. Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта!

7 Подготовка компонентов для анализа

7.1 Подготовка реагентов

Все компоненты набора реагентов разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C, убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 1-2 сек при 1000 об/мин., чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок. Не использовать вортекс для ПЦР-смеси с Taq ДНК-полимеразой, это может привести к инаktivации фермента.

ВНИМАНИЕ! После приготовления смесей для ПЦР немедленно поместить оставшиеся реагенты в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

ВНИМАНИЕ! Помимо клинических образцов ДНК в каждой постановке необходимо использовать ПКО, ОКО и H₂O, входящие в состав набора реагентов, все образцы тестировать в дублях.

7.2 Подготовка образцов

Выделение ДНК провести с помощью набора реагентов, предназначенного для выделения ДНК из образцов цельной крови, в соответствии с инструкцией по его применению, например, «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов (РеалБест экстракция 100) по ТУ 9398-464-23548172-2013», производства АО «Вектор-Бест» (ФСР 2010/08696 от 25 октября 2016 г.).

8 Проведение анализа

8.1 Приготовление смесей для ПЦР

8.1.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смеси с Taq ДНК-полимеразой и смесей праймеров с учётом погрешности при пипетировании. Состав реакционной смеси на одну реакцию приведен в таблице 2, для тестирования N клинических образцов ДНК в дублях указанное количество необходимо умножить на (2N + 7).

Таблица 2. Количество реагентов на одну реакцию

Реагент	Количество, мкл			
ПЦР-смесь с Taq ДНК-полимеразой	8	8	8	8
Смесь праймеров 4153-W	2	—	—	—
Смесь праймеров 4153-M	—	2	—	—
Смесь праймеров 6174-W	—	—	2	—
Смесь праймеров 6174-M	—	—	—	2
H ₂ O	12	12	12	12

ВНИМАНИЕ! Протоколы анализа на наличие мутаций BRCA1-4153delA и BRCA2-6174delT различаются. Если в распоряжении пользователя имеется два термоциклера для амплификации, анализ проводят параллельно. При наличии одного прибора анализ на разные мутации проводят последовательно.

8.1.2 Приготовить и промаркировать 4 пробирки объемом 1,5 мл:

- «4153-W» (для реакционной смеси, содержащей праймеры 4153-W),
- «4153-M» (для реакционной смеси, содержащей праймеры 4153-M),
- «6174-W» (для реакционной смеси, содержащей праймеры 6174-W),
- «6174-M» (для реакционной смеси, содержащей праймеры 6174-M).

8.1.3 Приготовить четыре реакционные смеси в пробирках объемом 1,5 мл согласно расчёту (пункт 8.1.1): внести в каждую пробирку расчётное количество ПЦР-смеси с Taq ДНК-полимеразой (пробирка №5, жёлтая крышка), воды (пробирка №8, белая крышка) и добавить соответствующую смесь праймеров (пробирки №1-№4 с фиолетовыми и зелёными крышками) и тщательно перемешать пипетированием (не использовать вортекс). Реакционные смеси готовы.

ВНИМАНИЕ! Использовать ПЦР-смесь немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходной ПЦР-смеси с Taq ДНК-полимеразой и праймеров сразу поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

8.1.4 Подготовить и промаркировать стрипы. **ВНИМАНИЕ!** Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать стрипы на крышках!

Пример расположения образцов при анализе пяти образцов ДНК на наличие мутации BRCA1-4153delA приведен на рисунке 1.

Смесь	Клинические образцы ДНК					Образцы из набора		
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО	ОКО	H ₂ O
4153-W	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО-4153	ОКО	H ₂ O
	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО-4153	ОКО	H ₂ O
	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W	4153-W
4153-M	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО-4153	ОКО	H ₂ O
	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО-4153	ОКО	H ₂ O
	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M	4153-M

Рисунок 1. Схема расположения пяти образцов ДНК в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок. Указаны номера образцов ДНК, ПКО, ОКО, H₂O и название ПЦР-смесей.

Пример расположения образцов при анализе пяти образцов ДНК на наличие мутации BRCA2-6174delT приведен на рисунке 2.

Смесь	Клинические образцы ДНК					Образцы из набора		
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО	ОКО	H ₂ O
6174-W	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО-6174	ОКО	H ₂ O
	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО-6174	ОКО	H ₂ O
	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W	6174-W
6174-M	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО-6174	ОКО	H ₂ O
	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ПКО-6174	ОКО	H ₂ O
	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M	6174-M

Рисунок 2. Схема расположения пяти образцов ДНК в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок. Указаны номера образцов ДНК, ПКО, ОКО, H₂O и название ПЦР-смесей.

8.1.5 Добавить в пробирки по 22 мкл готовых реакционных смесей «4153-W», «4153-M», «6174-W», «6174-M» и закрыть крышки.

8.1.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

- по 3 мкл воды в пробирки для воды;
- по 3 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;
- по 3 мкл ДНК клинических образцов в соответствующие пробирки;
- по 3 мкл ПКО-4153 или ПКО-6174 в пробирки для положительного контроля.

Каждую пробирку открывать перед добавлением образца и закрывать сразу после добавления.

8.1.7 Легко перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

8.1.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

8.1.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

8.2 Программирование и запуск термоциклера CFX96

8.2.1 Запрограммировать термоциклер для проведения ПЦР и детекции флуоресценции в соответствии с руководством по эксплуатации и п. 8.2.2-8.2.4.

8.2.2 Задать объём реакционной смеси 25 мкл. Запрограммировать протокол проведения ПЦР в соответствии с таблицей 3 для мутации BRCA1-4153delA и в соответствии с таблицей 4 для мутации BRCA2-6174delT.

Таблица 3. Протокол ПЦР в реальном времени для определения мутации BRCA1-4153delA

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	3 мин	Нет
10	Денатурация	95°C	10 сек	
	Отжиг праймеров	60°C	1 мин	
30	Денатурация	95°C	10 сек	Да
	Отжиг праймеров	60°C	55 сек	

Таблица 4. Протокол ПЦР в реальном времени для определения мутации BRCA2-6174delT

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	3 мин	Нет
10	Денатурация	95°C	10 сек	
	Отжиг праймеров	64°C	1 мин	
30	Денатурация	95°C	10 сек	Да
	Отжиг праймеров	64°C	55 сек	

8.2.3 Выбрать канал FAM для регистрации флуоресценции.

8.2.4 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

8.2.5 Запустить протокол ПЦР.

9 Анализ результатов

9.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

9.1.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для каждого образца определить значение порогового цикла (Ct) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает пороговый уровень (threshold level). Для получения величин Ct выставить вручную значение порогового уровня 100.

9.1.2 Проверить значения Ct по каналу FAM последовательно для H₂O, ОКО, ПКО-4153 или ПКО-6174 и клинических образцов ДНК.

9.1.3 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций BRCA1-4153delA и BRCA2-6174delT только в том случае, если величины Ct для H₂O, ОКО, ПКО-4153 или ПКО-6174 имеют допустимые значения (таблица 5):

- для H₂O во всех реакциях не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение Ct или определяется значение Ct больше либо равно 28;
- для ПКО-4153 в реакциях со смесями праймеров 4153-W и 4153-M наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение Ct меньше или равно 25;
- для ПКО-6174 в реакциях со смесями праймеров 6174-W и 6174-M наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение Ct меньше или равно 25;
- для ОКО в реакциях со смесями праймеров 4153-W и 6174-W наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение Ct меньше или равно 25 (далее обозначены как Ct_{4153-W} и Ct_{6174-W} соответственно);
- для ОКО в реакции со смесью праймеров 4153-M определяется значение Ct_{4153-M} больше либо равно (Ct_{4153-W}+2) и в реакции со смесью праймеров 6174-M определяется значение Ct_{6174-M} больше либо равно (Ct_{6174-W}+2).

Таблица 5. Допустимые значения Ct для H₂O, ОКО, ПКО-4153, ПКО-6174

Образец	Значение Ct в ПЦР со смесью		Результат
	4153-W и 6174-W	4153-M и 6174-M	
H ₂ O	Ct не определено или Ct $\geq$ 28		Валидный
ПКО-4153, ПКО-6174	Ct $\leq$ 25	Ct $\leq$ 25	Валидный
ОКО	Ct $\leq$ 25	Ct _{4153-M} $\geq$ Ct _{4153-W} + 2 ¹⁾ Ct _{6174-M} $\geq$ Ct _{6174-W} + 2 ²⁾	Валидный

¹⁾ Ct_{4153-M} – Ct ОКО в реакции со смесью праймеров 4153-M.

Ct_{4153-W} – Ct ОКО в реакции со смесью праймеров 4153-W.

²⁾ Ct_{6174-M} – Ct ОКО в реакции со смесью праймеров 6174-M.

Ct_{6174-W} – Ct ОКО в реакции со смесью праймеров 6174-W.

9.1.4 Если величины Ct контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если после повторного анализа значения Ct не соответствуют допустимым пределам, то результаты анализа не валидны. Возможные проблемы представлены в таблице 6.

Таблица 6. Другие возможные значения Ct и возможные проблемы

Образец	Значение Ct в ПЦР со смесью		Возможные проблемы
	4153-W и 6174-W	4153-M и 6174-M	
H ₂ O	Ct < 28		Возможна контаминация.
ПКО-4153, ПКО-6174	Ct > 25		Возможны ошибки при постановке, деградация ПЦР смеси и/или ПКО.
ОКО		Ct _{4153-M} < Ct _{4153-W} + 2 ²⁾ Ct _{6174-M} < Ct _{6174-W} + 2 ³⁾	Возможна контаминация.
	Ct > 25		Возможны ошибки при постановке, деградация ПЦР смеси и/или ОКО.

9.1.5 Для каждого клинического образца в реакции со смесью праймеров 4153-W и со смесью праймеров 6174-W должно наблюдаться нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяться значение Ct меньше или равно 25. Если для образца значение Ct не определено или больше 25, то концентрация ДНК недостаточна для анализа, для этого образца расчёт Δ Ct не проводится.

9.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутации BRCA1-4153delA

9.2.1 Если для клинического образца в реакции со смесью праймеров 4153-M значение C_t не определено, задать его равным 36.

9.2.2 Для каждого клинического образца рассчитать разницу $\Delta C_t = C_{t4153-M} - C_{t4153-W}$, где $C_{t4153-M}$ – среднее для двух дублей значение C_t образца в ПЦР со смесью праймеров 4153-M, $C_{t4153-W}$ – среднее для двух дублей значение C_t того же образца в ПЦР со смесью праймеров 4153-W.

9.2.3 Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию 4153delA в гене BRCA1 в гетерозиготном состоянии), если значение ΔC_t находится в диапазоне от -2 до 2 (рисунок 2А).

9.2.4 Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию 4153delA в гене BRCA1), если значение ΔC_t больше 2 (рисунок 2Б).

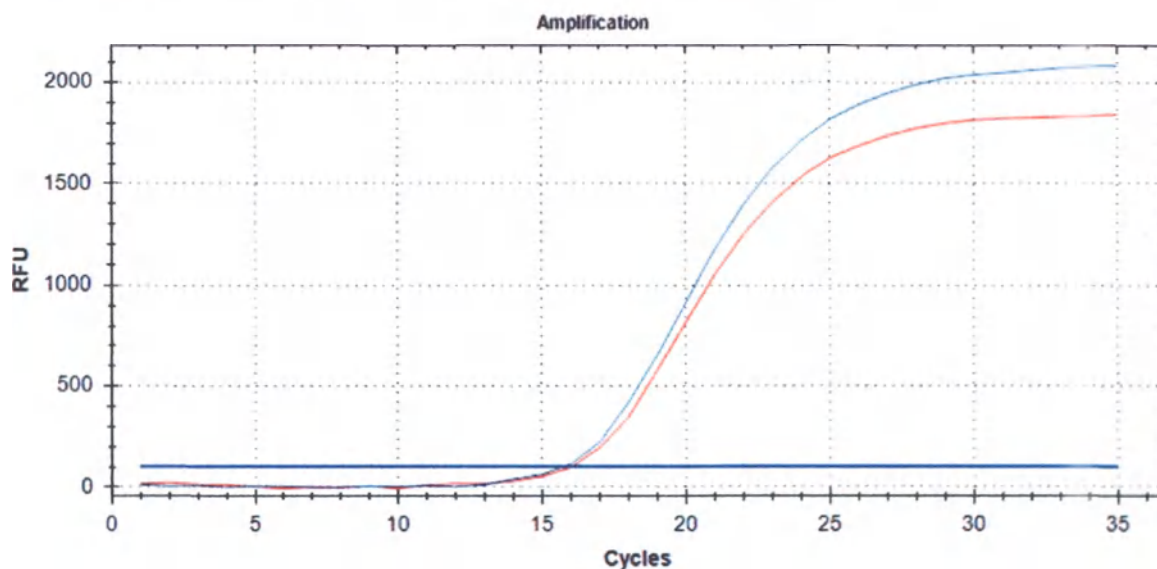


Рисунок 2. Примеры кривых флуоресценции в относительных единицах (RFU) в ПЦР со смесью праймеров 4153-W (синие линии) и в аллель-специфичной ПЦР со смесью праймеров 4153-M (красные линии)
А – образец, содержащий 10 нг ДНК с мутацией 4153delA в гене BRCA1

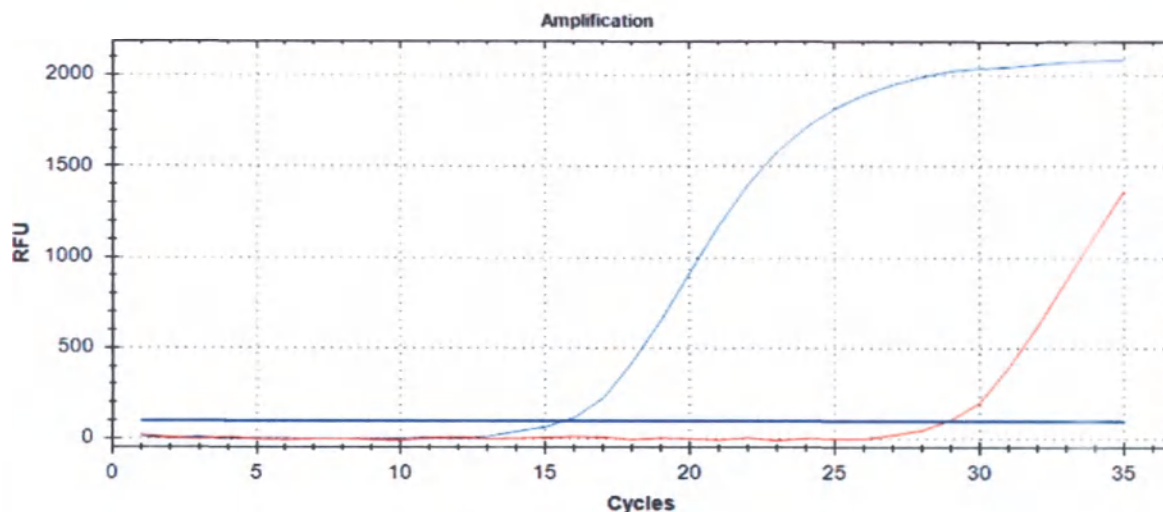


Рисунок 2. Примеры кривых флуоресценции в относительных единицах (RFU) в ПЦР со смесью праймеров 4153-W (синие линии) и в аллель-специфичной ПЦР со смесью праймеров 4153-M (красные линии)
Б – образец, содержащий 10 нг ДНК без мутации 4153delA в гене BRCA1

9.3 Анализ результатов ПЦР на наличие мутации BRCA2-6174delT

9.3.1 Если для клинического образца в реакции со смесью праймеров 6174-M значение C_t не определено, задать его равным 36.

9.3.2 Для каждого клинического образца рассчитать разницу $\Delta C_t = C_{t6174-M} - C_{t6174-W}$, где $C_{t6174-M}$ – среднее для двух дублей значение C_t образца в ПЦР со смесью праймеров 6174-M, $C_{t6174-W}$ – среднее для двух дублей значение C_t того же образца в ПЦР со смесью праймеров 6174-W.

9.3.3 Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию 6174delT в гене BRCA2 в гетерозиготном состоянии), если значение ΔC_t находится в диапазоне от -2 до 2 (рисунок 3А).

9.3.4 Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию 6174delT в гене BRCA2), если значение ΔC_t больше 2 (рисунок 3Б).

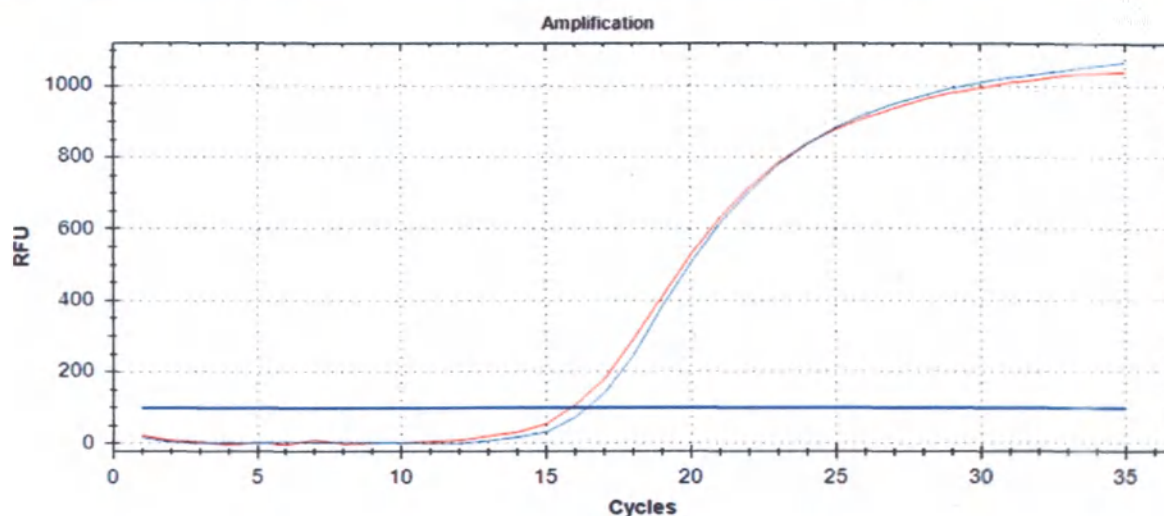


Рисунок 3. Примеры кривых флуоресценции в относительных единицах (RFU) в ПЦР со смесью праймеров 6174-W (синие линии) и в аллель-специфичной ПЦР со смесью праймеров 6174-M (красные линии).

А – образец, содержащий 10 нг ДНК с мутацией 6174delT в гене BRCA2

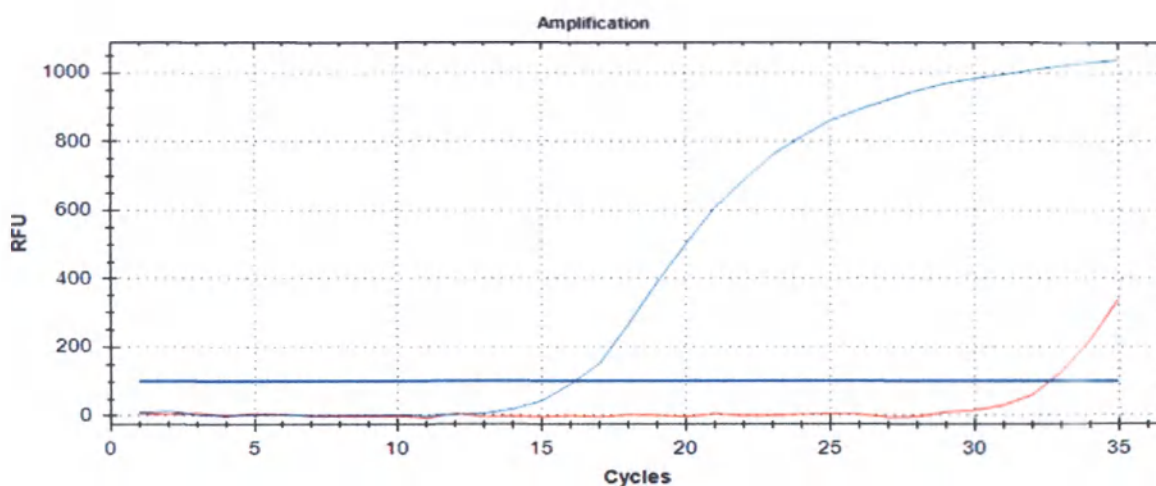


Рисунок 3. Примеры кривых флуоресценции в относительных единицах (RFU) в ПЦР со смесью праймеров 6174-W (синие линии) и в аллель-специфичной ПЦР со смесью праймеров 6174-M (красные линии).

Б – образец, содержащий 10 нг ДНК без мутации 6174delT в гене BRCA2

10 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации

10.1 Условия хранения

10.1.1 Хранить набор реагентов при температуре от минус 18°C до минус 25°C в течение всего срока годности в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, не допуская проникновения света.

10.1.2 Не подвергать набор реагентов замораживанию и размораживанию более трёх раз, общее время нахождения после оттаивания при температуре 22°C – не более 30 минут.

10.1.3 Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска или 3 месяца после первого вскрытия упаковки набора в зависимости от того, какая дата наступит раньше.

10.2 Условия транспортирования

10.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре не выше минус 18°C.

10.2.2 Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы (ХТЛ-4, ООО «Термологика» или аналогичные).

10.2.3 Срок транспортирования – не более 5 суток.

10.2.4 При транспортировании необходимо соблюдать условия, обеспечивающие сохранность набора реагентов от механического повреждения, неблагоприятного воздействия температуры окружающей среды, воздействия солнечного света.

ВНИМАНИЕ! Если реагенты прибыли незамороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «БиоЛинк» (см. раздел 11).

10.3 Условия эксплуатации

10.3.1 Использовать набор реагентов при комнатной температуре (от 18°C до 25°C).

10.3.2 Строго соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

10.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

11 Гарантийные обязательства

11.1 Производитель гарантирует соответствие качества набора реагентов требованиям нормативной и технической документации при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2 Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действий третьих лиц, либо обстоятельств непреодолимой силы.

11.3 В случае нарушения условий транспортирования, обнаружения повреждений упаковки, а также по вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обратиться к производителю ООО «БиоЛинк».

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13
Телефон: +7 (383) 209-32-40
Электронная почта: info@biolinklab.ru
Веб-сайт: biolinklab.ru

12 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Не допускать воздействия солнечного света		Дата изготовления (месяц, год)
	Обратитесь к инструкции по применению		Использовать до (месяц, год)
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Изготовитель

Библиография

1. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21 / J. M. Hall, M. K. Lee, B. Newman et al. // Science. – 1990. – V. 250 (4988). – P. 1684-1689.
2. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 / R. Wooster, G. Bignell, J. Lancaster et al. // Nature. – 1995. – V. 378 (6559). – P. 789-792.
3. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13 / R. Wooster, S. L. Neuhausen, J. Mangion et al. // Science. – 1994. – V. 265 (5181). – P. 2088-2090.
4. Associations of high-grade prostate cancer with BRCA1 and BRCA2 founder mutations / I. Agalliu, R. Gern, S. Leanza, R. Burk // Clin. Cancer Res. – 2009. – V. 15 (3). – P. 1112-1120.
5. Association between common variation in 120 candidate genes and breast cancer risk / P. D. Pharoah, J. Tyrer, A. M. Dunning et al. // PLoS Genet. – 2007. – № 3. – P. 42.
6. Genetic susceptibility to breast cancer / N. Mavaddat, A. C. Antoniou, D. F. Easton, M. Garcia-Closas // Mol. Oncol. – 2010. – № 4 (3). – P. 174-191.
7. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment / N. Lalwani, S. R. Prasad, R. Vikram et al. // Radiographics. – 2011. – V. 31. – P. 625-646.
8. Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies / A. Antoniou, P. D. Pharoah, S. Narod et al. // J. Med. Genet. – 2005. – № 42 (7). – P. 602-603.
9. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. / C. Turnbull, N. Rahman – 2008. – V. 9. – P. 321-345.
10. German consortium for hereditary breast and ovarian cancer. Evaluating the performance of the breast cancer genetic risk models BOADICEA, IBIS, BRCAPRO and Claus for predicting BRCA1/2 mutation carrier probabilities: a study based on 7352 families from the German Hereditary Breast and Ovarian Cancer Consortium / C. Fischer, K. Kuchenbäcker, C. Engel et al. // J. Med. Genet. – 2013. – № 50 (6). – P. 360-367.
11. Выявление мутаций, связанных с наследственными формами рака, у родственников больных раком молочной железы / Г. А. Пауль, Н. А. Матяш, Е. Е. Писарева и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2017. – Т. 16. № 4. – С. 84-88.
12. Особенности лечения пациентов с наследственными опухолями / В. М. Моисеенко, Н. М. Волков // Практическая онкология. – 2014. – Т. 15. № 3. – С. 118-125.

Производитель: ООО «БиоЛинк»

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: (383) 209-32-40, 382-99-07

E-mail: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru

Прошито, пронумеровано
и скреплено печатью

23 (двадцать три) листов

Директор ООО «БиоЛинк»
/ Корниенко А. А. /

