



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А.Н. Тороповский
«27» июля 2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ

Набор реагентов для качественного выявления мутаций в генах *BRCA1,2* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления
«*BRCA1,2*-диагностика»

ТУ 21.20.23-024-97638376-2020

Версия 3 от 27.07.2021

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Содержание

Введение.....	3
1. Назначение.....	5
2. Принцип метода.....	6
3. Состав набора реагентов.....	8
4. Характеристики набора реагентов.....	11
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «BRCA1,2 – диагностика».....	13
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	14
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором.....	16
8. Анализируемые образцы.....	17
9. Проведение анализа.....	21
10. Регистрация и интерпретация результатов.....	25
11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора.....	32
12. Утилизация.....	34
13. Гарантийные обязательства, контакты.....	35
Приложение А.....	36

Введение

Гены *BRCA1,2* являются классическими опухолевыми супрессорами, возникновение мутаций в этих генах приводит к нарушению регуляции клеточного цикла, процессов дифференцировки и апоптоза, а также к нарастанию хромосомной нестабильности, приводящей к повышению риска развития наследственных опухолевых заболеваний, таких как, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, эндометрия, яичников, меланомы, рак грудных желёз у мужчин¹.

Целевым анализом, выявляемым при помощи набора реагентов «*BRCA1,2* - диагностика», являются мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* - *BRCA1* с.5266dupC, *BRCA1* с.181T>G, *BRCA1* с.5251C>T, *BRCA1* с.5161C>T, *BRCA1* с.4035delA, *BRCA1* с.1961delA, *BRCA2* с.3749dupA, *BRCA1* с.4675G>A, *BRCA2* с.961_962insAA, *BRCA2* с.2897_2898del, *BRCA1* с.68_69del, *BRCA1* с.3700_3704del, *BRCA2* с.8754+1G, *BRCA1* с.4689C>G, *BRCA1* с.3756_3759del, *BRCA2* 6174delT.

Научная обоснованность целевого анализа заключается в его специфичности в отношении мутаций, локализованных в генах *BRCA1* и *BRCA2* человека.

Гены *BRCA1,2* относятся к группе генов-супрессоров, которые кодируют белки, вовлеченные в процесс репарации двухнитевых разрывов ДНК. При возникновении мутаций в этих генах теряется функция белков, вследствие чего нарушается основной механизм репарации двухнитевых разрывов ДНК.

Исследование для выявления мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* помогает определить наиболее эффективную стратегию лечения как таргетными препаратами (PARP-ингибиторами) так и различными режимами химиотерапии, а также возможность спрогнозировать течение заболевания рака молочной железы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желудка².

¹ Саптарова Л.М., Когина Э.Н., Хасаншина Л.М., Галимов Ш.Н. Анализ мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* у пациенток с раком молочной железы в эксперименте // Казанский медицинский журнал. – 2020. – Т. 101. – №3. – С. 342-346.

² Имянитов Е.Н. Общие представления р наследственных опухолевых синдромах // Практическая онкология. – 2014. – Т. 15. - № 3. – С. 101-106.

Исследование для выявления мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* помогает определить наиболее эффективную стратегию лечения как таргетными препаратами (PARP-ингибиторами) так и различными режимами химиотерапии, а также возможность спрогнозировать течение заболевания рака молочной железы, яичников, рака поджелудочной железы, желудка³.

Было показано, что *BRCA1*-ассоциированный РМЖ в отличие от спорадического характеризуется лучшей отвечаемостью на терапию вплоть до полной ремиссии. Установлено, что выживаемость больных наследственным раком органов женской репродуктивной системы значительно выше, чем в общей группе больных, независимо от стадии и проводимого лечения: 5-летняя выживаемость больных наследственным РМЖ составляет 58,9±6,3%, в то время как при спорадическом раке — 39,7±4,6%. Значение генетического тестирования определяется также тем, что *BRCA*-статус потенциально может быть использован в качестве предиктивного маркера при проведении химиотерапевтического лечения. Наличие дефектов системы репарации предполагает высокую эффективность ДНК-повреждающих агентов, таких как ионизирующая радиация и лекарственные препараты. Показана высокая эффективность неоадьювантной терапии антрациклинами и таксанами у носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Клетки с нарушенными механизмами гомологичной рекомбинации отличаются высокой чувствительностью к производным платины. В ряде исследований показано, что у больных *BRCA1*-ассоциированным РМЖ эффективна неоадьювантная терапия «Цисплатином», выраженная реакция на препарат независимо связана с трижды негативным фенотипом и с наличием мутации в гене *BRCA1*⁴.

Показано, что *BRCA1/2*-дефицитные опухолевые клетки селективно гибнут при использовании PARP-ингибиторов (PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) — ферменты, катализирующие поли-АДФ-рибозилирование; участвуют в репарации ДНК). Показано,

что *BRCA1/2*-дефицитные опухолевые клетки селективно гибнут при использовании PARP-ингибиторов, в частности «Олапариба»⁵.

Область применения набора реагентов — клиническая лабораторная диагностика, онкология.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: Набор реагентов «*BRCA1,2* — диагностика» рекомендуется применять для диагностики наследственных форм опухолевых заболеваний (рака молочной железы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желудка) с целью определения эффективной стратегии лечения и прогнозирования эффективности лечения.

Применяемый способ исследования ДНК относится к неинвазивным процедурам, не несёт угрозы здоровью человека и не вызывает осложнений.

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

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия: популяционных, демографических аспектов применения набора реагентов «*BRCA1,2* — диагностика» не выявлено.

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «*BRCA1,2* — диагностика» предназначен для качественного выявления мутаций в генах *BRCA1* (с.5266dupC, с.181T>G, с.5251C>T, с.4035delA, с.5161C>T, с.4675G>A, с.68_69del, с.3700_3704del, с.1961delA, с.4689C>G, с.3756_3759del), *BRCA2* (с.3749dupA, с.961_962insAA, с.2897_2898del, с.8754+1G>A, 6174delT), методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме кривых плавления в пробе геномной ДНК человека, выделенной из клинического материала (периферическая кровь, буккальный соскоб), для диагностики наследственных форм опухолевых заболеваний (рака молочной железы, рака яичников, рака

³ Имянитов Е.Н. Общие представления о наследственных опухолевых синдромах // Практическая онкология. — 2014. — Т. 15. — № 3. — С. 101-106.

⁴ Gelmon K. et al. Targeting triple-negative breast cancer: optimising therapeutic outcomes // Ann Oncol. — 2012. — Vol. 23. — № 9. — P. 2223-2234.

⁵ Oza A. M. et al. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial // Lancet Oncol. — 2015. — Vol. 16. — № 1. — P. 87-89

поджелудочной железы, рака желудка) с целью определения эффективной стратегии лечения и прогнозирования эффективности лечения.

Функциональное назначение. Полученные результаты могут использоваться для диагностики наследственных форм опухолевых заболеваний (рака молочной железы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желудка) с целью определения эффективной стратегии лечения и прогнозирования эффективности лечения.

Потенциальные потребители медицинского изделия

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

2. Принцип метода

Метод

Мультиплексная аллель-специфическая полимеразная цепная реакция в реальном времени с детекцией кривых плавления.

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ПЦР служат пробы геномной ДНК человека, выделенные из клинического материала (периферическая кровь, буккальный соскоб).

Принцип определения

Выявление мутаций в генах *BRCA1,2* - *BRCA1* с.5266dupC, *BRCA1* с.181T>G, *BRCA1* с.5251C>T, *BRCA1* с.5161C>T, *BRCA1* с.4035delA, *BRCA1* с.1961delA, *BRCA2* с.3749dupA, *BRCA1* с.4675G>A, *BRCA2* с.961_962insAA, *BRCA2* с.2897_2898del, *BRCA1* с.68_69del, *BRCA1* с.3700_3704del, *BRCA2* с.8754+1G, *BRCA1* с.4689C>G, *BRCA1* с.3756_3759del, *BRCA2* 6174delT методом мультиплексной ПЦР с детекцией кривых плавления в пробе геномной ДНК человека, выделенной из клинического материала (периферическая кровь, буккальный соскоб), включает в себя 3 этапа:

1. Подготовку ПЦР;

2. ПЦР-амплификацию ДНК и гибридационно-флуоресцентную детекцию продуктов амплификации в режиме реального времени с детекцией кривых плавления;
3. Интерпретацию результатов.

С пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков генов при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров в реакционном буфере.

В состав ПЦР-буфера входят все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу, смесь dNTP, ионы магния и оптимизированный буфер.

В составе праймер-микса присутствуют флуоресцентно-меченные олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени. По окончании ПЦР проводится этап температурного плавления дуплексов, вследствие чего происходит изменение уровня флуоресценции, который фиксируется программным обеспечением прибора и представляется в виде графиков.

Набор содержит реагенты для мультиплексного определения высокоспецифичных участков геномной ДНК генов *BRCA1,2* - *BRCA1* с.5266dupC, *BRCA1* с.181T>G, *BRCA1* с.5251C>T, *BRCA1* с.5161C>T, *BRCA1* с.4035delA, *BRCA1* с.1961delA, *BRCA2* с.3749dupA, *BRCA1* с.4675G>A, *BRCA2* с.961_962insAA, *BRCA2* с.2897_2898del, *BRCA1* с.68_69del, *BRCA1* с.3700_3704del, *BRCA2* с.8754+1G, *BRCA1* с.4689C>G, *BRCA1* с.3756_3759del, *BRCA2* 6174delT (табл. 1).

Таблица 1 – Состав мультиплексов, входящих в набор

Мультиплекс (праймер-микс)	Канал, соответствующий флуорофору	
	FAM/ Green	HEX/ Yellow
5266/181	<i>BRCA1</i> с.5266dupC	<i>BRCA1</i> с.181T>G
5251/5161	<i>BRCA1</i> с.5251C>T	<i>BRCA1</i> с.5161C>T
4035/1961	<i>BRCA1</i> с.4035delA	<i>BRCA1</i> с.1961delA
3749/4675	<i>BRCA2</i> с.3749dupA	<i>BRCA1</i> с.4675G>A

961/2897	<i>BRCA2</i> с.961_962insAA	<i>BRCA2</i> с.2897_2898del
68/3700	<i>BRCA1</i> с.68_69del	<i>BRCA1</i> с.3700_3704del
8754/4689	<i>BRCA2</i> с.8754+1G>A	<i>BRCA1</i> с.4689C>G
3756/6174	<i>BRCA1</i> с.3756_3759del	<i>BRCA2</i> 6174delT

Ограничения метода

Возможная причина получения ложноположительного результата - контаминация на этапе выделения ДНК либо проведения реакции мультиплексной ПЦР. Ложноположительный результат может быть выявлен с помощью отрицательного контрольного образца.

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

Использование набора с истёкшим сроком годности или нарушение условий хранения набора.

Нарушение условий хранения при транспортировании образцов.

Время проведения реакции мультиплексной ПЦР составляет 90 мин. (без учета пробоподготовки).

3. Состав набора реагентов

Варианты исполнения

Набор реагентов выпускается в одном варианте исполнения - «*BRCA1,2* – диагностика».

Количество анализируемых проб

Каждый набор «*BRCA1,2* – диагностика» содержит реагенты, рассчитанные для проведения 48 реакций каждого мультиплекса (5266/181 - *BRCA1* с.5266dupC, *BRCA1* с.181T>G; 5251/5161 - *BRCA1* с.5251C>T, *BRCA1* с.5161C>T; 4035/1961 - *BRCA1* с.4035delA, *BRCA1* с.1961delA; 3749/4675 - *BRCA2* с.3749dupA, *BRCA1* с.4675G>A; 961/2897 - *BRCA2* с.961_962insAA, *BRCA2* с.2897_2898del; 68/3700 - *BRCA1* с.68_69del, *BRCA1* с.3700_3704del; 8754/4689 - *BRCA2* с.8754+1G>A, *BRCA1* с.4689C>G; 3756/6174 - *BRCA1* с.3756_3759del, *BRCA2* 6174delT), что соответствует определению 36 исследуемых образцов, включая положительные и

отрицательные контрольные образцы или 12 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Состав набора

Таблица 2 – Состав формы комплектации «*BRCA1,2* – диагностика»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1	ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	3 пробирки по 1280 мкл
2	Праймер-микс 5266/181	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
3	Праймер-микс 5251/5161	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
4	Праймер-микс 4035/1961	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
5	Праймер-микс 3749/4675	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
6	Праймер-микс 961/2897	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
7	Праймер-микс 68/3700	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
8	Праймер-микс 8754/4689	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
9	Праймер-микс 3756/6174	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
10	Положительный контрольный образец (нормальная гомозигота) - N (ПКО-N)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 576 мкл
11	Положительный контрольный образец (мутантная гомозигота) - M (ПКО-M)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 576 мкл
12	Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 576 мкл

ПЦР-буфер готов к использованию и содержит все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу, смесь dNTP, ионы магния и оптимизированный буфер.

Праймер-микс 5266/181 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к мутации в гене *BRCA1* с.5266dupC. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к мутации в гене *BRCA1* с.181T>G. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Праймер-микс 5251/5161 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* с.5251C>T. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* с.5161C>T. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Праймер-микс 4035/1961 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* с.4035delA. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* с.1961delA. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Праймер-микс 3749/4675 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к мутации *BRCA2* с.3749dupA. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* с.4675G>A. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Праймер-микс 961/2897 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к мутации *BRCA2* с.961_962insAA. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к мутации *BRCA2* с.2897_2898del. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Праймер-микс 68/3700 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* с.68_69del. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* с.3700_3704del. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Праймер-микс 8754/4689 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к мутации *BRCA2* с.8754+1G>A. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* с.4689C>G. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Праймер-микс 3756/6174 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

3. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* с.3756_3759del. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
4. Праймеры и зонд к мутации *BRCA2* 6174delT. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Положительный контрольный образец - N (ПКО-N) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК – нормальные варианты генов *BRCA1,2*, заключённых в плазмидные вектора pUC57-BsaI-Free и pAI-TA с концентрацией 10 000 коп в 1 мкл ТЕ буфера.

Положительный контрольный образец - M (ПКО-M) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК – специфический фрагменты с мутациями в генах *BRCA1* (с.5266dupC, с.181T>G, с.5251C>T, с.4035delA, с.5161C>T, с.4675G>A, с.68_69del, с.3700_3704del, с.1961delA, с.4689C>G, с.3756_3759del), *BRCA2* (с.3749dupA, с.961_962insAA, с.2897_2898del, с.8754+1G>A, 6174delT), заключённых в плазмидный вектор pAI-TA с концентрацией 10 000 коп в 1 мкл ТЕ буфера.

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

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

4. Характеристики набора реагентов

4.1 Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Набор реагентов «*BRCA1,2* – диагностика».

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
1. Технические характеристики		1
1.1 Внешний вид		

ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 5266/181	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 5251/5161	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 4035/1961	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 3749/4675	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 961/2897	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 68/3700	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 8754/4689	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 3756/6174	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Положительный контрольный образец (нормальная гомозигота)- N (ПКО-N)	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Положительный контрольный образец (мутантная гомозигота) - M (ПКО-M)	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-024-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 1.5 ТУ 21.20.23-024-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 1.6 ТУ 21.20.23-024-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
2. Функциональные характеристики		
Положительный результат с ПКО-N	Регистрация наличия одного пика плавления и определение температуры плавления по каналам FAM/Green и HEX/Yellow	Раздел 7, пункт 7.8.3
Положительный результат с ПКО-M	Регистрация наличия одного пика плавления и определение температуры плавления по каналам FAM/Green и HEX/Yellow	Раздел 7, пункт 7.8.3
Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM/Green и HEX/Yellow отсутствуют пики плавления и	Раздел 7, пункт 7.8.3

	температура плавления.	
--	------------------------	--

4.2. Характеристики аналитической эффективности

Аналитическая специфичность	Специфичен по отношению к мутациям в генах <i>BRCA1</i> (с.5266dupC, с.181T>G, с.5251C>T, с.4035delA, с.5161C>T, с.4675G>A, с.68_69del, с.3700_3704del, с.1961delA, с.4689C>G, с.3756_3759del), <i>BRCA2</i> (с.3749dupA, с.961_962insAA, с.2897_2898del, с.8754+1G>A, 6174delT)
Аналитическая чувствительность	10 копий гена <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> в 1 мкл раствора ДНК

4.3 Характеристики клинической эффективности

Таблица 4 – Характеристики клинической эффективности

Вид исследуемого материала	Число проб	Количество наблюдений	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Периферическая кровь	31	62	100% (95% ДИ:85,8%-100%)	100% (95% ДИ:90,7%-100%)
Буккальный соскоб	22	44	100% (95% ДИ:83,2%-100%)	100% (95% ДИ:85,8%-100%)

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «*BRCA1,2* – диагностика»

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
2. контаминация реакционных смесей с образцами исследуемой ДНК содержимым из пробирки ПКО или продуктами ПЦР;
3. проведение анализа с использованием пробы ДНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);
4. невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;

5. использование непригодного для применения набора (использование по истечению срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия Набор реагентов для качественного выявления мутаций в генах *BRCA1,2* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «*BRCA1,2* – диагностика» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

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

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «*BRCA1,2* – диагностика», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «*BRCA1,2* – диагностика», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «*BRCA1,2* – диагностика», не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работу с материалом, заражённым или подозрительным на заражённость, проводят в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил по безопасности работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13), МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения

контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, МУ 1.3.2569-09.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

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

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.

1. применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;
2. допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по ПЦР-диагностике, а также лаборанта со средним специальным медицинским образованием);
3. не использовать набор по истечении срока годности;

4. избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

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

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

Работа с набором реагентов для мультиплексной ПЦР «BRCA1,2 – диагностика» осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

1. ПЦР-бокс биологической безопасности II и III класса защиты (например, «БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия).
2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объёма (например, «Eppendorf», Германия).
4. Холодильник от 2°C до 8°C с морозильной камерой не выше минус 16°C.
5. Амплификатор⁶ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow, например, CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

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

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, «Axygen», США).
2. Одноразовые пробирки Эппендорф на 1,5 мл;
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой для ПЦР:
 - пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл,
 - пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл в стрипах,
 - планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, «Axygen», США).
4. Отдельный халат и одноразовые перчатки без талька.
5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором.
6. Штативы «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ПЦР служат пробы геномной ДНК человека, выделенные из клинического материала (периферическая кровь, буккальный соскоб).

8.1 Процедура получения клинического материала

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012.

Забор материала на исследование

Периферическая кровь.

Забор материала осуществляется натошак или через три часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в специальную вакуумную систему (сиреневые крышки – 6% раствор ЭДТА) или одноразовым шприцем в пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 1:9). Пробирку закрывают крышкой и аккуратно

переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется и выделение ДНК станет невозможным).

Гепарин в качестве коагулянта использовать нельзя!

Буккальный соскоб

Взятие биоматериала осуществляется с внутренней стороны щеки с использованием специальных одноразовых зондов.

Взятие материала осуществляется натошак или через час-полтора после еды, необходимо воздержаться от питья, курения и применения жевательной резинки за час до сбора образцов.

Круговым движением вскрыть пробирку, убедившись в целостности защитной полоски.

Тампоном потереть с небольшой силой внутреннюю поверхность одной, затем другой щеки в течение 30 сек. (25-30 раз), одновременно прокручивая зонд. После забора тампон (рабочая часть зонда) помещают в стерильную одноразовую пробирку с защёлкивающейся крышкой, содержащей соответствующую транспортную среду, и аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Условия транспортирования, хранения и утилизации исходного клинического материала:

Образцы цельной крови

- при +2 ... +8°C – не более 24 ч.
- при -18 ... -22°C – не более 6 месяцев.

Образцы буккального соскоба

- при комнатной температуре – в течение 6 часов.
- при температуре +2 ... +8°C – в течение 3 суток.
- при температуре -20°C – в течение 1 месяца.
- при температуре -70°C – длительно.

Допускается однократное замораживание материала, при условии невозможности его доставки в лабораторию.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Утилизация клинического материала (класс В), как чрезвычайно эпидемиологически опасных отходов, осуществляется в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

8.2 Процедура получения пробы геномной ДНК человека, выделенной из клинического материала (периферическая кровь, буккальный соскоб)

Для выделения пробы геномной ДНК человека из клинического материала (периферическая кровь, буккальный соскоб) рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот «РеалБест экстракция 100» производства АО Вектор-Бест, Россия (Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/06867),

или аналогичных, предназначенных для выделения ДНК из клинического материала (периферическая кровь, буккальный соскоб) и обеспечивающих следующее качество выделенной ДНК

- чистота выделения ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей (A260/280nm) - не менее 1,7;
- эффективность выделения ДНК – не менее 25%.

Во время процедуры выделения ДНК необходимо строго соблюдать протокол и требования инструкции применяемого набора реагентов.

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК

- при +2 ... +8°C – не более суток (24 ч),
- при -18 ... -22°C – не более месяца,
- при минус 80°C – длительно.

8.3 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «BRCA1,2 – диагностика» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);

2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение клинического образца гемоглобином крови или слизью (гиалуроновая кислота) может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения ДНК;

3) вещества, добавляемые во время подготовки образца (например, антикоагулянты, транспортная среда)

Исследуемые концентрации интерферирующих веществ, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «BRCA1,2 – диагностика», приведены в таблице 5.

Таблица 5

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества	
Гемоглобин	260 мкг/мл
Гиалуроновая кислота	50 мкг/мл
Экзогенные интерферирующие вещества	
Вещества, добавляемые во время подготовки образца	
Гепарин (антикоагулянт)	0,15 МЕ/мл
Цитрат натрия (антикоагулянт)	0,1 мМ/мл
EDTA-K2 (антикоагулянт)	0,5 мМ/мл
Азид натрия (консервант транспортной среды)	0,075 ммоль/мл
Препараты, назначаемые для лечения онкологических заболеваний	
Ропивакаин (обезболивающее средство)	0,02 мг/мл
Бевацизумаб (применяется для терапии колоректального рака, рака яичника, рака шейки матки, рака почки, глиобластомы, рака легкого, рака молочной железы)	0,02 мг/мл
Паклитаксел (профилактика и лечение немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака яичников)	0,006 мг/мл
Капецитабин (препарат для лечения рака молочной железы, рака желудка и колоректального рака)	0,03 мг/мл

Гемцитабин (показан при раке поджелудочной железы, раке легкого, раке мочевого пузыря)	0,04 мг/мл
Цисплатин (противоопухолевое средство)	0,002 мг/мл

На основании результатов исследования к ингибиторам ПЦР при проведении анализа отнесен гепарин (антикоагулянт) в концентрации 0,15 МЕ/мл. Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта при взятии периферической крови.

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

Ограничения по использованию анализируемого материала:

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

- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом

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

9. Проведение анализа

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

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

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать согласно таблице 8 непосредственно перед проведением анализа.

9.1 Выделение ДНК из биологического материала

Рекомендуется использование следующих комплектов для экстракции:

- Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот «РеалБест экстракция 100» производства АО Вектор-Бест, Россия (Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/06867),

или других аналогичных наборов, предназначенных для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала.

Во время процедуры выделения ДНК необходимо строго соблюдать протокол и требования инструкции применяемого набора реагентов.

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК

- при +2 ...+8°C – не более суток (24 ч),
- при -18 ...-22°C – не более месяца,
- при минус 80°C – длительно.

9.2. Проведение ПЦР

Подготовка компонентов набора для ПЦР

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

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа ДНК, ПЦР-буфером, Праймер-миксами, ОКО, ПКО-N и ПКО-M переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3-5 сек., затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

2. Отобрать необходимое количество пробирок объёмом 0,1-0,2 мл для ПЦР из расчёта для каждого используемого мультиплекса: количество исследуемых образцов⁷ + 1 ПКО-N + 1 ПКО-M + 1 ОКО.

В зависимости от необходимости выявления конкретных мутаций и используемого варианта комплектации набора, каждый образец ставится с одним или несколькими мультиплексами (праймер-миксами). В таблице 5 приведена схема расположения ПЦР-пробирок при использовании восьми мультиплексов.

Таблица 5 – Схема расположения пробирок для ПЦР

Мультиплекс	Образец 1	Образец n	ПКО	ОКО
5266/181	○	○	○	○
5251/5161	○	○	○	○
4035/1961	○	○	○	○
3749/4675	○	○	○	○
961/2897	○	○	○	○
68/3700	○	○	○	○
8754/4689	○	○	○	○
3756/6174	○	○	○	○

Для приготовления каждой реакции необходимо:

1. ПЦР-буфер – 10 мкл,
2. Соответствующий праймер-микс (5266/181, 5251/5161, 4035/1961, 3749/4675, 961/2897, 68/3700, 8754/4689, 3756/6174) – 4 мкл,
3. Образец (исследуемый образец ДНК⁹, ПКО-N, ПКО-M, ОКО) – 6 мкл.

Общий объем реакции – 20 мкл.

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

⁷ Для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец в двух повторях.

Протокол проведения ПЦР

Готовить реакционные пробирки необходимо согласно таблице 8 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,2 мл для ПЦР. Для каждого мультиплекса берётся необходимое количество пробирок для исследуемых образцов + 1 ПКО-N + 1 ПКО-M + 1 ОКО (таблица 5).

2. Внести в каждую пробирку по 10 мкл ПЦР-буфера⁸.

3. Внести по 4 мкл Праймер-миксов (5266/181, 5251/5161, 4035/1961, 3749/4675, 961/2897, 68/3700, 8754/4689, 3756/6174) в пробирки для соответствующих мультиплексов (таблица 5)⁸.

4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 6 мкл выделенной ДНК⁹. В пробирки для ПКО-N, ПКО-M и ОКО ДНК не вносится.

6. Внести в соответствующие пробирки каждого используемого мультиплекса по 6 мкл ПКО-N и ПКО-M.

7. Внести в соответствующие пробирки каждого используемого мультиплекса по 6 мкл ОКО.

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

9. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

10. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ПЦР указан в таблице 6.

11. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

⁸ Рекомендуется сначала приготовить смесь праймер-микса и ПЦР-буфера для каждого мультиплекса в отдельной пробирке на 1,5-2,0 мл из расчёта: $(n+3) \times 4$ мкл ПЦР-буфера + $(n+3) \times 10$ мкл соответствующего праймер-микса, где n – количество образцов. Перемешать на вортексе, осадить капли коротким центрифугированием и внести по 14 мкл в ПЦР-пробирки для соответствующего мультиплекса согласно таблице 8.

⁹ Для предотвращения ингибирования ПЦР объём образца может быть снижен до 1-5 мкл, при этом объём реакции доводится до 20 мкл деионизированной водой из ОКО.

Таблица 6 – Протокол ПЦР

Стадия	Температура, °C	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	02:00	-	1
2	94	00:15		5
	67	00:30	FAM/Green, HEX/Yellow	
3	94	00:05	-	45
	67	00:30	FAM/Green, HEX/Yellow,	
4	25	00:30	-	1
5	25	00:15	FAM/Green, HEX/Yellow, Δt	50 (1,0)

12. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow.

13. Запустить ПЦР-PB с детекцией кривых плавления.

14. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

10. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят по завершении ПЦР автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Интерпретация результатов выполняется по значениям температуры плавления по каналам FAM/Green, HEX/Yellow (табл. 7).

Таблица 7 – Интерпретация результатов по каналам FAM/Green, и HEX/Yellow

Мультиплексе (праймер-микс)	Канал, соответствующий флуорофору	
	FAM/Green	HEX/Yellow

5266/181	<i>BRCA1</i> с.5266dupC	<i>BRCA1</i> с.181T>G
5251/5161	<i>BRCA1</i> с.5251C>T	<i>BRCA1</i> с.5161C>T
4035/1961	<i>BRCA1</i> с.4035delA	<i>BRCA1</i> с.1961delA
3749/4675	<i>BRCA2</i> с.3749dupA	<i>BRCA1</i> с.4675G>A
961/2897	<i>BRCA2</i> с.961_962insAA	<i>BRCA2</i> с.2897_2898del
68/3700	<i>BRCA1</i> с.68_69del	<i>BRCA1</i> с.3700_3704del
8754/4689	<i>BRCA2</i> с.8754+1G>A	<i>BRCA1</i> с.4689C>G
3756/6174	<i>BRCA1</i> с.3756_3759del	<i>BRCA2</i> 6174delT

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Сначала оценивают прохождение реакции и значения температуры плавления в контрольных образцах. Интерпретацию результатов в исследуемых образцах начинают только при правильном прохождении ПКО и ОКО.

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (табл. 8).

Таблица 8 – Результаты исследования для отрицательного и положительных контрольных образцов

Внесенный	Выбранный флуорофор
-----------	---------------------

материал	FAM/Green (<i>BRCA1</i> с.5266dupC, <i>BRCA1</i> с.5251C>T, <i>BRCA1</i> с.4035delA, <i>BRCA2</i> с.3749dupA, <i>BRCA2</i> с.961_962insAA, <i>BRCA1</i> с.68_69del, <i>BRCA2</i> с.8754+1G>A, <i>BRCA1</i> с.3756_3759del)	HEX/Yellow (<i>BRCA1</i> с.181T>G, <i>BRCA1</i> с.5161C>T, <i>BRCA1</i> с.1961delA, <i>BRCA1</i> с.4675G>A, <i>BRCA2</i> с.2897_2898del, <i>BRCA1</i> с.3700_3704del, <i>BRCA1</i> с.4689C>G, <i>BRCA2</i> 6174delT)
ОКО	Отсутствует	Отсутствует
ПКО-N	Должно фиксироваться наличие одного пика плавления и определяться температура плавления	
ПКО-M	Должно фиксироваться наличие одного пика плавления и определяться температура плавления	

При получении для отрицательного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 8, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 8, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 8, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Принципы интерпретации результатов отражены в таблицах 9-16.

Таблица 9 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 5266/5251 (определение наличия мутаций *BRCA1* с.5266dupC, *BRCA1* с.181T>G)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°С	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°С	N/N – нормальная гомозигота (мутации <i>BRCA1</i> с.5266dupC, <i>BRCA1</i> с.181T>G не обнаружены)
Один пик плавления, отличающийся от	Один пик плавления, отличающийся от	N/с.181T>G – обнаружена мутация

ПКО-N не более чем на 2°C	ПКО-M не более чем на 2°C	<i>BRCA1</i> с.181T>G
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	с.5266dupC/N – обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.5266dupC
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Таблица 10 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 5266/5251 (определение наличия мутаций *BRCA1* с.5251C>T, *BRCA1* с.5161C>T)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	N/N – нормальная гомозигота (мутации <i>BRCA1</i> с.5251C>T, <i>BRCA1</i> с.5161C>T не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	N/c.5161C>T – обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.5161C>T
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	с.5251C>T/N – обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.5251C>T
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип

Таблица 11 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 5266/5251 (определение наличия мутаций *BRCA1* с.4035delA, *BRCA1* с.1961delA)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от	Один пик плавления, отличающийся от	N/N – нормальная гомозигота (мутации

ПКО-N не более чем на 2°C	ПКО-N не более чем на 2°C	<i>BRCA1</i> с.4035delA, <i>BRCA1</i> с.1961delA не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	N/c.1961delA – обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.1961delA
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	с.4035delA/N – обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.4035delA
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Таблица 12 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 3749/4675 (определение наличия мутаций *BRCA2* с.3749dupA, *BRCA1* с.4675G>A)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	N/N – нормальная гомозигота (мутации <i>BRCA2</i> с.3749dupA, <i>BRCA1</i> с.4675G>A не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	N/c.4675G>A – обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.4675G>A
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	с.3749dupA/N – обнаружена мутация <i>BRCA2</i> с.3749dupA
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Таблица 13 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 961/470 (определение наличия мутаций *BRCA2* с.961_962insAA, *BRCA2* с.2897_2898del)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	N/N – нормальная гомозигота (мутации <i>BRCA2</i> с. 961_962insAA, <i>BRCA2</i> с.2897_2898del не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	N/c.2897_2898del – обнаружена мутация <i>BRCA2</i> с.2897_2898del
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	с. 961_962insAA/N – обнаружена мутация <i>BRCA2</i> с. 961_962insAA
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Таблица 14 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 68/3700 (определение наличия мутаций *BRCA1* с.68_69del, *BRCA1* с.3700_3704del)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	N/N – нормальная гомозигота (мутации <i>BRCA1</i> с.68_69del, <i>BRCA1</i> с.3700_3704del не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	N/c.3700_3704del – обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.3700_3704del)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	с.68_69del/N – обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.68_69del
Температура плавления отличается от ПКО-N		Результат

и ПКО-M более чем на 2°C	сомнительный
--------------------------	--------------

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Таблица 15 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 68/3700 (определение наличия мутаций *BRCA2* с.8754+1G>A, *BRCA1* с.4689C>G)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	N/N – нормальная гомозигота (мутации <i>BRCA2</i> с.8754+1G>A, <i>BRCA1</i> с.4689C>G не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	N/c.4689C>G – обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.4689C>G
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	с.8754+1G>A/N – обнаружена мутация <i>BRCA2</i> с.8754+1G>A
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Таблица 16 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 3756/6174 (определение наличия мутаций *BRCA1* с.3756_3759del, *BRCA2* 6174delT)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	N/N – нормальная гомозигота (мутации <i>BRCA1</i> с.3756_3759del, <i>BRCA2</i> 6174delT не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем	M/M – мутантная гомозигота (мутации <i>BRCA1</i>

на 2°C	на 2°C	<i>c.3756_3759del, BRCA2 6174delT</i> (обнаружены)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	<i>N/6174delT</i> – обнаружена мутация <i>BRCA2 6174delT</i>
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	<i>c.3756_3759del/N</i> – обнаружена мутация <i>BRCA1 c.3756_3759del</i>
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Для исключения ложноотрицательных результатов рекомендуется повторно провести ПЦР выделенного препарата ДНК.

Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация ДНК, присутствие ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверное выполнение протокола анализа; несоблюдение температурного режима ПЦР и др.

В случае невалидного и сомнительного результата заключение не выдаётся, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ.

При повторении сомнительного результата повторить исследование набором реагентов другого производителя или другим методом.

11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение

Набор «*BRCA1,2* – диагностика» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от минус 16 до минус 24°C в течение всего срока годности набора

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

ПЦР-буфер перед использованием разморозить при комнатной

температуре и хорошо перемешать переворачиванием пробирки без образования пены.

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

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов «*BRCA1,2* – диагностика» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Набор «*BRCA1,2* – диагностика» транспортировать при температуре от минус 16 до минус 24°C в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от -2 до 8 °C до 30 суток, или при температуре от 15 до 25°C не более 5 суток.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

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

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

Срок годности

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

Срок годности вскрытых компонентов набора

12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от минус 16 до минус 24°C.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

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

12. Утилизация

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

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 170 СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета (кроме жёлтого и красного).

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

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

Потребительская упаковка набора реагентов «BRCA1,2 – диагностика» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

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

13. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «BRCA1,2 – диагностика» требованиям ТУ при соблюдении установленных требований к транспортированию, хранению и эксплуатации.

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

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен»
(ООО «ТестГен»),
432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13
Тел.: +7 (499) 705-03-75
www.testgen.ru

Служба технической поддержки:
Тел.: +7 927 981 58 81
E-mail: help@testgen.ru

Инструкция по применению соответствует требованиям Приказа Минздрава России от 09.01.2014 №2н, Приказа Минздрава России от 19.01.2017 № 11н, ГОСТ 51088-2013.

Приложение А

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
ГОСТ 15150-69	Машины, приборы и другие технические изделия. Исполнения для различных климатических районов. Категории, условия эксплуатации, хранения и транспортирования в части воздействия климатических факторов внешней среды
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения
ГОСТ 18321-73	Статистический контроль качества. Методы случайного отбора выборок штучной продукции
ГОСТ Р 50444-2020	Приборы, аппараты и оборудование медицинские. Общие технические условия

СанПиН 2.1.3684-21	Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий
ОСТ 7625-86	Бумага этикеточная. Технические условия
ОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования
ОСТ 15.309-98	Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения
ОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ОСТ 12.1.005-88	Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны
ОСТ Р 8.657-2016	Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Фотометрия импульсная. Термины и определения
	Номенклатурная классификация медицинских изделий по видам, утвержденная приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н (в редакции приказа Минздрава России от 25.09.2014 № 557н «О внесении изменения в приложение № 1 к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2012 г. № 4н «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий»).
	Приказ Минздрава России от 09.01.2014 N 2н

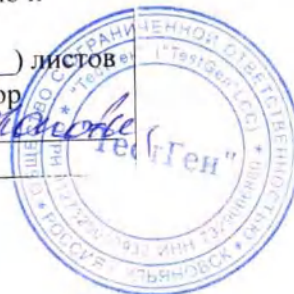
	«Об утверждении Порядка проведения оценки соответствия медицинских изделий в форме технических испытаний, токсикологических исследований, клинических испытаний в целях государственной регистрации медицинских изделий»
--	--

П р и м е ч а н и е – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

10 (десять) листов

Должность: ген. директор
Тороповский А.Н.





ООО «ТестГен»

Паспорт качества № 204

Набор реагентов для качественного выявления мутаций в генах BRCA1,2 методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «BRCA1,2-диагностика»

Номер серии (лот) 202107-204
Количество наборов в серии 3
Дата изготовления 2021-07
Срок годности 2022-07

КОПИЯ
ВЕРНА

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР

А. В. ТОРОПОВСКИЙ



Состав и характеристики набора:

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Полученный результат	Вывод о соответствии
1. Технические характеристики			
1.1 Внешний вид и состав набора			
1.1.1 ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, 3 пробирки, по 1280 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость, 3 пробирки (по 1280 мкл)	Соответствует
1.1.2 Праймер-микс 5266/181	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Соответствует
1.1.3 Праймер-микс 5251/5161	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Соответствует
1.1.4 Праймер-микс 4035/1961	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Соответствует
1.1.5 Праймер-микс 3749/4675	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Соответствует
1.1.6 Праймер-микс 961/2897	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Соответствует
1.1.7 Праймер-микс 68/3700	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Соответствует
1.1.8 Праймер-микс 8754/4689	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Соответствует
1.1.9 Праймер-микс 3756/6174	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Прозрачная жидкость сиреневого цвета, 1 пробирка, 192 мкл	Соответствует
1.1.10 ПКО-N	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 576 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 576 мкл	Соответствует
1.1.11 ПКО-M	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 576 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 576 мкл	Соответствует
1.1.12 ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 576 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 576 мкл	Соответствует
1.2 Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-024-97638376-2020	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-024-97638376-2020	Соответствует
1.3 Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-024-97638376-2020	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-024-97638376-2020	Соответствует
1.4 Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-024-97638376-2020	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-024-97638376-2020	Соответствует
2. Функциональные характеристики			
2. Положительный результат с ПКО-N	Регистрация наличия одного пика плавления и определение температуры плавления по каналам FAM/Green и HEX/Yellow	По каналам FAM/Green и HEX/Yellow имеется один пик плавления и определяется температура плавления по каждому мультиплексу	Соответствует
2.1 Положительный результат с ПКО-M	Регистрация наличия одного пика плавления и определение температуры плавления по каналам FAM/Green и HEX/Yellow	По каналам FAM/Green и HEX/Yellow имеется один пик плавления и определяется температура плавления по каждому мультиплексу	Соответствует
2.2 Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM/Green и HEX/Yellow отсутствуют пики плавления и температура плавления	По каналам FAM/Green и HEX/Yellow пики плавления и температура плавления отсутствуют.	Соответствует

Хранение

Набор «BRCA1,2-диагностика» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от минус 16 до минус 24°C в течение всего срока годности набора

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

ПЦР-буфер перед использованием разморозить при комнатной температуре и хорошо перемешать перемешиванием пробирки без образования пены.

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

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов «BRCA1,2-диагностика» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Набор «BRCA1,2-диагностика» транспортировать при температуре от минус 16 до минус 24°C в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8 °C до 30 суток, или при температуре от 15 до 25°C не более 5 суток.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными кладоэлементами. Тип, объем и количество кладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объем термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

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

Набор реагентов соответствует ТУ 21.20.23-024-97638376-2020

Дата выдачи паспорта: 17.06.2021

Штамп ОТК: