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

ИНСТРУКЦИЯ

Набор реагентов для качественного выявления мутаций в генах системы HRR методом мультиплексной ПЦР-РВ с детекцией кривых плавления в пробе геномной ДНК человека из клинического материала «HRR-скрининг»

ТУ 21.20.23-018-97638376-2019

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Содержание

Список сокращений 3
Введение 4
1. Назначение 6
2. Принцип метода 7
3. Состав набора реагентов 9
4. Характеристики набора реагентов 13
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «HRR-скрининг» 16
6. Меры предосторожности при работе с набором 16
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором 19
8. Анализируемые образцы 20
9. Подготовка компонентов набора для исследования 24
10. Проведение анализа 26
11. Регистрация и интерпретация результатов 28
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора 35
13. Утилизация 37
14. Гарантийные обязательства, контакты 38
Приложение А 39

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО-N	Положительный контрольный образец (нормальная гомозигота)- N
ПКО-M	Положительный контрольный образец (мутантная гомозигота) - M

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Введение

Наследственные опухолевые синдромы – группа заболеваний, связанная с передачей из поколение в поколение практически фатальной предрасположенности к тому или иному виду рака.

Наиболее частым и известными являются синдром наследственного рака молочной железы и яичников, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак простаты, которые вызываются мутациями в генах BRCA1, 2, CHEK2, PALB2[1],[2].

Целевым аналитом, выявляемым при помощи набора реагентов «HRR-скрининг», являются мутации в генах *HRR*, ассоциированных с развитием наследственных опухолевых синдромов - *BRCA1* (c.5266dupC, c.181T>G, c.5251C>T, c.4035delA, c.5161C>T, c.4675G>A, c.68_69del, c.3700_3704del, c.1961delA), *BRCA2* (c.3749dupA, c.961_962insAA), *CHEK2* (c.470T>C, c.1100delC, c.444+1G>A, c.893_897del), *PALB2* (c.1592delT).

Научная обоснованность целевого аналита заключается в его специфичности в отношении мутаций, локализованных в генах *HRR - BRCA1,2, CHEK и PALB2* человека.

Гены HRR – это группа генов, продукты которых участвуют в процессе репарации ДНК путем гомологичной рекомбинации (homologous recombination repair). Гены *BRCA1,2* относятся к группе генов-супрессоров, которые кодируют белки, вовлеченные в процесс репарации двунитевых разрывов ДНК. Наличие мутаций в этих генах вызывает потерю функций этих белков, и как следствие увеличивается риск возникновения злокачественных новообразований, таких как, рак молочной железы, рак яичников, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак простаты.

Ген репарации ДНК – *CHEK2* – локализован на длинном плече 22 хромосомы (22q12.1), содержит 14 экзонов и занимает 50 кб ДНК. Продукт экспрессии гена *CHEK2* активизируется в ответ на повреждение (двунитевые разрывы) ДНК, что ведет к апоптозу, остановке клеточного цикла. При мутации *CHEK2* 1100delC экспрессия киназы либо нарушена, либо снижена. Мутации в гене

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

[2] Копосов П.В. Мутации генов BRCA1,2 при раке предстательной железы. Имеются ли перспективы для их клинического применения // Онкоурология. – 2016. – Т.12. – №2. – С. 80-83.

CHEK2 увеличивают риск развития РМЖ в 2–3 раза и до 5 раз на фоне семейного онкологического анамнеза[3].

Исследование для выявления мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* помогает определить предрасположенность к наследственным опухолевым синдромам[4]. Патогенетический механизм развития заболевания опосредован нарушением в данных генах репарации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) различной степени пенетрантности. Большинство клинических случаев наследственного рака ассоциировано с мутациями именно в этих генах, которые обеспечивают также защиту организма от трансформированных клеток, провоцирующих появление опухолевых новообразований[5].

В неповреждённом состоянии оба гена (*BRCA1* и *BRCA2*) являются классическими опухолевыми супрессорами, и кодируемые ими белки играют ведущую роль в репарации разрывов двухцепочечных ДНК путём гомологичной рекомбинации[6]. Потеря функциональной активности вследствие врождённых или приобретённых мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* приводит к нарушению регуляции клеточного цикла, процессов дифференцировки и апоптоза, а также к нарастанию хромосомной нестабильности, приводящей к повышению риска развития РМЖ, рака предстательной железы, яичников, а также рака грудных желёз у мужчин[1].

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика, онкология.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: Набор реагентов «HRR-скрининг» рекомендуется применять для скрининга наследственных опухолевых синдромов (рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака простаты) с целью

[3] . CHEK2 Breast Cancer Consortium. CHEK2 1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10860 breast cancer cases and 9065 controls from 10 studies // Am. J. Hum. Genet. – 2004. – № 74. – P. 1175–1182

[4] Бойчук С.В., Рамазанов Б.Р. Нарушение системы репарации ДНК — роль в онкогенезе и терапии злокачественных новообразовании // Казанский медицинский журнал. – 2014. – Т. 95. - № 3. – С. 307-314.

[5] Имянитов Е.Н. Биология опухолевого процесса. // Практическая онкология. – 2017. – Т. 18. - №4. – С. 307-315.

[6] Имянитов Е.Н. Биология рака молочной железы // Практическая онкология. – 2017. Т. 18. - №3. – С. 221-231.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

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 «HRR-скрининг» не выявлено.

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «HRR-скрининг» предназначен для качественного выявления мутаций в генах *HRR* - *BRCA1* (c.5266dupC, c.181T>G, c.5251C>T, c.4035delA, c.5161C>T, c.4675G>A, c.68_69del, c.3700_3704del, c.1961delA), *BRCA2* (c.3749dupA, c.961_962insAA), *CHEK2* (c.470T>C, c.1100delC, c.444+1G>A, c.893_897del), *PALB2* (c.1592delT), методом мультиплексной ПЦР-РВ с детекцией результатов в режиме кривых плавления в пробе геномной ДНК человека, выделенной из клинического материала (периферическая кровь, буккальный соскоб), для скрининга наследственных опухолевых синдромов (рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака простаты) с целью определения эффективной стратегии лечения и прогнозирования эффективности лечения.

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

Потенциальные потребители медицинского изделия

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

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

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 *HRR* - *BRCA1* (c.5266dupC, c.181T>G, c.5251C>T, c.4035delA, c.5161C>T, c.4675G>A, c.68_69del, c.3700_3704del, c.1961delA), *BRCA2* (c.3749dupA, c.961_962insAA), *CHEK2* (c.470T>C, c.1100delC, c.444+1G>A, c.893_897del), *PALB2* (c.1592delT) 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 гибридизационно-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 дНТФ и оптимизированный для ПЦР буфер.

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

Набор содержит реагенты для мультиплексного определения высокоспецифичных участков геномной ДНК генов *HRR* - *BRCA1* (c.5266dupC, c.181T>G, c.5251C>T, c.4035delA, c.5161C>T,

c.4675G>A, c.68_69del, c.3700_3704del, c.1961delA), *BRCA2* (c.3749dupA, c.961_962insAA), *CHEK2* (c.470T>C, c.1100delC, c.444+1G>A, c.893_897del), *PALB2* (c.1592delT) (табл. 1).

Таблица 1 – Состав мультиплексов, входящих в набор

Мультиплекс (праймер-микс)	Канал, соответствующий флуорофору	
	FAM/ Green	HEX/ Yellow
5266/181	*BRCA1* c.5266dupC	*BRCA1* c.181T>G
5251/5161	*BRCA1* c.5251C>T	*BRCA1* c.5161C>T
4035/1961	*BRCA1* c.4035delA	*BRCA1* c.1961delA
3749/4675	*BRCA2* c.3749dupA	*BRCA1* c.4675G>A
470/961	*CHEK2* c.470T>C	*BRCA2* c.961_962insAA
68/3700	*BRCA1* c.68_69del	*BRCA1* c.3700_3704del
1100/444	*CHEK2* c.1100delC	*CHEK2* c.444+1G>A
1592/893	*PALB2* c.1592delT	*CHEK2* c.893_897del

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.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

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 представлен в одном варианте исполнения - «*HRR*-скрининг».

Количество анализируемых проб

Каждый набор «*HRR*-скрининг» содержит реагенты, рассчитанные для проведения 48 реакций каждого мультиплекса (5266/181 - *BRCA1* c.5266dupC, *BRCA1* c.181T>G; 5251/5161 - *BRCA1* c.5251C>T, *BRCA1* c.5161C>T; 4035/1961 - *BRCA1* c.4035delA, *BRCA1* c.1961delA; 3749/4675 - *BRCA2* c.3749dupA, *BRCA1* c.4675G>A; 470/961 - *BRCA2* c.961_962insAA, *CHEK2* c.470T>C; 68/3700 - *BRCA1* c.68_69del, *BRCA1* c.3700_3704del; 1100/444 - *CHEK2* c.1100delC, *CHEK2* c.444+1G>A; 1592/893 - *PALB2* c.1592delT, *CHEK2* c.893_897del), 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

№ 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 470/961	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
7	Праймер-микс 68/3700	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
8	Праймер-микс 1100/444	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
9	Праймер-микс 1592/893	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
10	ПКО-N	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 576 мкл
11	ПКО-M	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 576 мкл
12	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 576 мкл

Таблица 2 – Состав набора реагентов «HRR-скрининг»

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* c.5266dupC. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к мутации в гене *BRCA1* c.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* c.5251C>T. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* c.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* c.4035delA. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* c.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* c.3749dupA. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* c.4675G>A. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Праймер-микс 470/961 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к мутации CHEK2 *c.470T>C*. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к мутации *BRCA2* c.961_962insAA. 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* c.68_69del. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* c.3700_3704del. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Праймер-микс 1100/444 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к мутации *CHEK2* c.1100delC. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к мутации *CHEK2* c.444+1G>A. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Праймер-микс 1592/893 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к мутации *PALB2* c.1592delT. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

2. Праймеры и зонд к мутации *CHEK2* c.893_897del. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Положительный контрольный образец - N (ПКО-N) готов к использованию и представляет собой геномную ДНК из культуры клеток человека линии Jurkat (производства «Thermo Fisher Scientific») 1 000 копий в 1 мкл в ТЕ-буфере (10 мМ Трис-HCl, 0,1 мМ ЭДТА).

Положительный контрольный образец - М (ПКО-М) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК – специфический фрагменты с мутациями в генах *BRCA1* (c.5266dupC, c.181T>G, c.5251C>T, c.4035delA, c.5161C>T, c.4675G>A, c.68_69del, c.3700_3704del, c.1961delA), *BRCA2* (c.3749dupA, c.961_962insAA), *CHEK2* (c.470T>C, c.1100delC, c.444+1G>A, c.893_897del), *PALB2* (c.1592delT), заключенных в плазмидный вектор pAl-TA с концентрацией 10 000 коп/1мкл в ТЕ-буфере (10 мМ Трис-HCl, 0,1 мМ ЭДТА).

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 «HRR-скрининг».

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
1. Технические характеристики		
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 470/961	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 68/3700	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 1100/444	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 1592/893	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО-N	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО-М	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-018-97638376-2019	Раздел 7, пункт 7.12
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-018-97638376-2019	Раздел 7, пункт 7.12
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-018-97638376-20219	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

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Положительный результат с ПКО-М	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 температура плавления	Раздел 7, пункт 7.8.3

4.2. Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к мутациям в генах *BRCA1* (c.5266dupC, c.181T>G, c.5251C>T, c.4035delA, c.5161C>T, c.4675G>A, c.68_69del, c.3700_3704del, c.1961delA), *BRCA2* (c.3749dupA, c.961_962insAA), *CHEK2* (c.470T>C, c.1100delC, c.444+1G>A, c.893_897del), *PALB2* (c.1592delT).

Аналитическая специфичность целевых фрагментов генов BRCA1, BRCA2 подтверждалась in silico с помощью ресурса BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

4.2.2 Аналитическая чувствительность

10 копий генов *BRCA1, BRCA2, CHEK2, PALB2* в 1 мкл раствора ДНК

4.2.3 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости положительные контрольные образцы ПКО-N и ПКО-М были исследованы по 10 повторов.

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

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

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 2%.

4.2.4 Прецизионность в условиях воспроизводимости

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

При проведении прецизионности в условиях воспроизводимости наблюдалась полная внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 3%.

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	35	70	100% (95% ДИ:86,8%-100%)	100% (95% ДИ:92%-100%)
Буккальный соскоб	28	56	100% (95% ДИ:83,2%-100%)	100% (95% ДИ:90,3%-100%)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «HRR-скрининг»

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. Потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
2. Перекрестная контаминация образцов;
3. Загрязнение клинического материала ингибирующими веществами в концентрациях, превышающих допустимые;
4. Контаминация реакционных смесей и образцов исследуемой ДНК содержимым из пробирки ПКО или продуктами ПЦР;
5. Проведение анализа с использованием пробы ДНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);
6. Невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;
7. Использование непригодного для применения набора (использование по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия Набора реагентов для качественного выявления мутаций в генах системы HRR методом мультиплексной ПЦР-РВ с детекцией кривых плавления в пробе геномной ДНК человека из клинического материала «HRR-скрининг» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2б – 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 «HRR-скрининг», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

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

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

Работу с материалом, заражённым или подозрительным на заражённость, проводят в соответствии требованиями СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", 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.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

Работа с набором реагентов для мультиплексной ПЦР «HRR-скрининг» 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 °С до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
5. Амплификатор[7] с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow, например, CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм», «ДТлайт» («ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия), Rotor-Gene 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

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 0,1 мл и 0,2 мл,
   - пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл в стрипах,
   - планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, «Axygen», США).

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

4. Отдельный халат и одноразовые перчатки без талька.

5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором.

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объёмом 0,1 мл, 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

7. Набор для выделения ДНК из клинического материала (см. п. 8.2).

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 натощак 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 EDTA-K2) 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 натощак 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

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

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°С – не более 24 ч.
- при -18 … -22°С – не более 6 месяцев.

Образцы буккального соскоба

- при комнатной температуре – в течение 6 часов.
- при температуре +2 … +8°С – в течение 3 суток.
- при температуре -20°С – в течение 1 месяца.
- при температуре -70°С – 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 (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009, производства ООО "НПО ДНК-Технология", Россия,

(Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/08867 от 13.10.2016 г.),

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 (А260/280нм) - 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°С – не более суток (24 ч),
- при -18 …-22°С – не более месяца,
- при минус 80°С – длительно.

8.3 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «HRR-скрининг» 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 «HRR-скрининг», приведены в таблице 5.

Таблица 5

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества	
Гемоглобин	0,35 мг/мл
Гиалуроновая кислота	0,25 ммоль/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
Бикалутамид (Препарат в терапии рака предстательной железы)	0,01 мг/мл
Гемцитабин (показан при раке поджелудочной железы, раке легкого, раке мочевого пузыря)	0,04 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.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо
правила взятия клинического материала.

ничения по использованию анализируемого
:

лизируемый материал не подлежит использованию при
условий хранения и транспортировки (температура,
ельность);

допускается использование образцов, загрязнённых
м биологическим материалом

допускается использование гепарина в качестве
янта при взятии периферической крови.

дготовка компонентов набора для исследования

овка, монтаж, настройка, калибровка медицинского
ввода в эксплуатацию не требуется.

МАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать
оразовые стерильные пластиковые расходные материалы,
специальную маркировку «DNase-free». Обязательно
ть отдельный наконечник с аэрозольным барьером для
мпонента реакции.

МАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует
согласно таблице 6 непосредственно перед проведением

приготовлением реакций необходимо произвести
борку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов
ся в нём, с применением дезинфицирующих средств
для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ
-30 мин.

ательно перемешать содержимое пробирок с выделенно
а ДНК, ПЦР-буфером, Праймер-миксами, ОКО, ПКО-N
реворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая н
а низкой скорости в течение 3-5 сек., затем осадить кап
робирок коротким центрифугированием.

2. Отобрать необходимое количество пробирок объёмом 0,1-0,2 мл для ПЦР из расчёта для каждого используемого мультиплекса: количество исследуемых образцов[8] + 1 ПКО-N + 1 ПКО-M + 1 ОКО.

В зависимости от необходимости выявления конкретных мутаций каждый образец ставится с одним или несколькими мультиплексами (праймер-миксами). В таблице 6 приведена схема расположения ПЦР-пробирок при использовании восьми мультиплексов.

Таблица 6 – Схема расположения пробирок для ПЦР

Мультиплекс	**Образец 1**	**Образец n**	**ПКО-N**	**ПКО-M**	**ОКО**
5266/181	○	○	○	○	○
5251/5161	○	○	○	○	○
4035/1961	○	○	○	○	○
3749/4675	○	○	○	○	○
470/961	○	○	○	○	○
68/3700	○	○	○	○	○
1100/444	○	○	○	○	○
1592/893	○	○	○	○	○

[8] *Для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец в*
ух повторах.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

1. Подготовка ПЦР;
2. ПЦР-амплификация ДНК и гибридизационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме реального времени с детекцией кривых плавления;
3. Интерпретацию результатов (подробно описано в главе 11).

А) Подготовка ПЦР

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

Общий объём реакции – 20 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции. При изменении объёма чувствительность метода резко снижается!

Для приготовления каждой реакции необходимо:

1. ПЦР-буфер – 10 мкл,
2. Соответствующий праймер-микс (5266/181, 5251/5161, 4035/1961, 3749/4675, 470/961, 68/3700, 1100/444, 1592/893) – 4 мкл,
3. Образец (исследуемый образец ДНК[9], ПКО-N, ПКО-М, ОКО) – 6 мкл.

Готовить реакционные пробирки необходимо согласно таблице 6 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 мл и 0,2 мл для ПЦР. Для каждого мультиплекса берётся необходимое количество пробирок для исследуемых образцов + 1 ПКО-N + 1 ПКО-М + 1 ОКО (таблица 6).

2. Внести в каждую пробирку по 10 мкл ПЦР-буфера[9].

3. Внести по 4 мкл Праймер-миксов (5266/181, 5251/5161, 4035/1961, 3749/4675, 470/961, 68/3700, 1100/444, 1592/893) в пробирки для соответствующих мультиплексов (таблица 6)[8].

[9] 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) мкл ПЦР-буфера + (n+3)x10 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 ... согласно таблице 8.

4. *Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 6 мкл выделенной ДНК[10]. В пробирки для ПКО-N, ПКО-М и ОКО ДНК не вносится.*

6. *Внести в соответствующие пробирки каждого используемого мультиплекса по 6 мкл ПКО-N, ПКО-М.*

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.*

Б) ПЦР-амплификация и гибридизационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме реального времени с детекцией кривых плавления

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

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

2. *Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ПЦР указан в таблице 7.*

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

Таблица 7 – Протокол ПЦР

Стадия	Температура, °С	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,	

[10] *Для предотвращения ингибирования ПЦР объём образца может быть ...жен до 1-5 мкл, при этом объём реакции доводится до 20 мкл деионизованной ...ой из ОКО.*

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4	95	00:05	-	1
5	25	00:30	-	1
6	25	00:15	FAM/Green, HEX/Yellow, Δt	50 (1,0)

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

5. Запустить ПЦР-РВ с детекцией кривых плавления.

6. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

11. 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. 8).

Таблица 8 – Интерпретация результатов по каналам FAM/Green, и HEX/Yellow

Мультиплекс (праймер-микс)	**Канал, соответствующий флуорофору**	
	FAM/ Green	**HEX/ Yellow**
5266/181	*BRCA1* c.5266dupC	*BRCA1* c.181T>G
5251/5161	*BRCA1* c.5251C>T	*BRCA1* c.5161C>T
4035/1961	*BRCA1* c.4035delA	*BRCA1* c.1961delA
3749/4675	*BRCA2* c.3749dupA	*BRCA1* c.4675G>A
470/961	*CHEK2* c.470T>C	*BRCA2* c.961_962insAA
68/3700	*BRCA1* c.68_69del	*BRCA1* c.3700_3704del
1100/444	*CHEK2* c.1100delC	*CHEK2* c.444+1G>A
1592/893	*PALB2* c.1592delT	*CHEK2* c.893_897del

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. 9).

Таблица 9 – Результаты исследования для отрицательного и положительных контрольных образцов

Внесенный материал	Выбранный флуорофор	
	FAM/Green (*BRCA1* c.5266dupC, BRCA1 c.5251C>T, BRCA1 c.4035delA, *BRCA2* c.3749dupA, *CHEK2* c.470T>C, *BRCA1* c.68_69del, *CHEK2* c.1100delC, *PALB2* c.1592delT)	HEX/Yellow (*BRCA1* c.181T>G, *BRCA1* c.5161C>T, *BRCA1* c.1961delA, *BRCA1* c.4675G>A, *BRCA2* c.961_962insAA, *BRCA1* c.3700_3704del, *CHEK2* c.444+1G>A, *CHEK2* c.893_897del)
ОКО	Отсутствует	Отсутствует
ПКО-N ПКО-M	Должно фиксироваться наличие одного пика плавления и определяться температура плавления	

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

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

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

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Принципы интерпретации результатов отражены в таблицах 10-17.

Таблица 10 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 5266/181 (определение наличия мутаций *BRCA1* c.5266dupC, *BRCA1* c.181T>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 *BRCA1* c.5266dupC, *BRCA1* c.181T>G не обнаружены)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	N/c.181T>G – обнаружена мутация *BRCA1* c.181T>G
Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	c.5266dupC/N – обнаружена мутация *BRCA1* c.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 11 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 5251/5161 (определение наличия мутаций *BRCA1* c.5251C>T, *BRCA1* c.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 *BRCA1* c.5251C>T, *BRCA1* c.5161C>T не обнаружены)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	N/c.5161C>T – обнаружена мутация *BRCA1* c.5161C>T
Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	c.5251C>T/N – обнаружена мутация *BRCA1* c.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 12 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 4035/1961 (определение наличия мутаций *BRCA1* c.4035delA, *BRCA1* c.1961delA)

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 *BRCA1* c.4035delA, *BRCA1* c.1961delA не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	N/c.1961delA – обнаружена мутация *BRCA1* c.1961delA

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-М и ПКО-N не более чем на 2°С	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°С	c.4035delA/N – обнаружена мутация *BRCA1* c.4035delA
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-М более чем на 2°С		Результат сомнительный

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

Таблица 13 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 3749/4675 (определение наличия мутаций *BRCA2* c.3749dupA, *BRCA1* c.4675G>A)

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 *BRCA2* c.3749dupA, *BRCA1* c.4675G>A не обнаружены)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°С	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-М и ПКО-N не более чем на 2°С	N/c.4675G>A – обнаружена мутация *BRCA1* c.4675G>A
Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-М и ПКО-N не более чем на 2°С	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°С	c.3749dupA/N – обнаружена мутация *BRCA2* c.3749dupA
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-М более чем на 2°С		Результат сомнительный

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

Таблица 14 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 470/961 (определение наличия мутаций *CHEK2* c.470T>C, *BRCA2 c.961_962insAA*)

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 *BRCA2 c.961_962insAA, CHEK2 c.470T>C* не обнаружены)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°С	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-М и ПКО-N не более чем на 2°С	N/ *c.961_962insAA* – обнаружена мутация *BRCA2 c.961_962insAA*
Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-М и ПКО-N не более чем на 2°С	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°С	*c.470T>C* /N – обнаружена мутация *CHEK2 c.470T>C*
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-М более чем на 2°С		Результат сомнительный

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

Таблица 15 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 68/3700 (определение наличия мутаций *BRCA1 c.68_69del, BRCA1 c.3700_3704del*)

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 *BRCA1 c.68_69del, BRCA1 c.3700_3704del* не обнаружены)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°С	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-М и ПКО-N не более чем на 2°С	N/*c.3700_3704del* – обнаружена мутация *BRCA1 c.3700_3704del*
Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-М и ПКО-N не более чем на 2°С	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°С	*c.68_69del*/N – обнаружена мутация *BRCA1 c.68_69del*
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-М более чем на 2°С		Результат сомнительный

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

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 16 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 1100/444 (определение наличия мутаций *CHEK2* c.1100delC, *CHEK2* c.444+1G>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 *CHEK2 c.1100delC, CHEK2 c.444+1G>A* не обнаружены)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	N/ *c.444+1G>A* – обнаружена мутация *CHEK2 c.444+1G>A*
Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	*c.1100delC*/N – гетерозигота обнаружена мутация *CHEK2 c.1100delC*
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

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

Таблица 17 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 1592/893 (определение наличия мутаций *PALB2* c.1592delT, *CHEK2* c.893_897del)

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 *PALB2 c.1592delT, CHEK2 c.893_897del* не обнаружены)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	N/*c.893_897del* – обнаружена мутация *CHEK2 c.893_897del*
Два пика плавления, отличающиеся от	Один пик плавления, отличающийся от	*c.1592delT*/N – обнаружена мутация *PALB2 c.1592delT*

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	ПКО-N не более чем на 2°C	
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.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение

Набор «HRR-скрининг» 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 «HRR-скрининг» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Набор «HRR-скрининг» транспортировать при температуре от минус 16 до минус 24°С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8 °С до 30 суток, или при температуре от 15 до 25°С 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°С.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

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

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

13. Утилизация

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

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к 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) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

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

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

14. Гарантийные обязательства, контакты

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

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

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен»
(ООО «ТестГен»),
432072 г. Ульяновск, 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.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Приложение А

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 ин витро. 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
ГОСТ 7625-86	Бумага этикеточная. Технические условия
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования
ГОСТ 15.309-98	Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ГОСТ 12.1.005-88	Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны
ГОСТ 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»

Примечание – 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.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью
22 (двадцать два) листов
Должность: ген. директор
Тороповский А.Н.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU