

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для определения мутаций 3819del5 и T300G в гене *BRCA1*

методом полимеразной цепной реакции с детекцией кривых плавления

«РеалБест-Генетика *BRCA1* 3819del5/T300G»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения мутаций 3819del5 и T300G в гене *BRCA1* методом полимеразной цепной реакции с детекцией кривых плавления «РеалБест-Генетика *BRCA1* 3819del5/T300G» предназначен для качественного определения генотипа по мутациям 3819del5 и T300G в гене *BRCA1*, ассоциированным с риском развития рака молочной железы/рака яичников (РМЖ/РЯ), методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией кривых плавления в режиме реального времени. Набор может быть применён как вспомогательное средство диагностики при определении наследственных факторов риска развития РМЖ/РЯ и у пациентов с уже выявленным РМЖ/РЯ для уточнения разновидности рака (семейная форма, ассоциированная с мутацией гена *BRCA1*). Набор может быть применён для образцов геномной ДНК человека, выделенной из цельной крови или Buccalного эпителия.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота).

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) <i>Описание.</i>	Количество
Контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия аزيد (0,05%)</i>	1 пробирка, 1 мл
Контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия аزيد (0,05%)</i>	1 пробирка, 1 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) <i>Лиофилизированная</i>	48 пробирок
Элюирующий раствор «Генетика» <i>Бесцветная жидкость</i>	2 фл., по 12 мл
Оптическая пленка	1 лист
Вкладыш с информацией о диапазонах температур плавления для КО1 и КО2	1 шт.

2.3. Условия применения.

Аналитические и диагностические характеристики набора были валидированы при выделении ДНК из клинических образцов (цельной крови, буккального эпителия) с использованием наборов реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс», «РеалБест ГенМаг» производства АО «Вектор-Бест», позволяющих получить концентрацию ДНК человека не менее 250 копий на реакционную пробирку (на 50 мкл препарата выделенной ДНК).

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) или «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность набора по стандартному образцу предприятия, содержащему образцы с известными генотипами по мутациям 3819del5 и T300G в гене *BRCA1*, определенными методом секвенирования по Сэнгеру, составляет 100 %.

3.2. Аналитическая чувствительность – минимальное количество ДНК человека, достаточное для получения валидного результата анализа, 250 копий на реакционную пробирку (на 50 мкл препарата выделенной ДНК).

3.3. Аналитическая специфичность – для оценки аналитической специфичности был проведен *in silico* анализ последовательностей праймеров и зондов по базе нуклеотидных последовательностей ДНК человека и по базам последовательностей вирусов и микроорганизмов, которые могут присутствовать в ротовой полости или в крови. Перекрестно реагирующих нецелевых участков генома человека и вирусов или микроорганизмов обнаружено не было. Возможность перекрестных реакций исключена.

3.4. Диагностическая чувствительность:

- в отношении мутации 3819del5 диагностическая чувствительность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов с мутацией 3819del5 в гене *BRCA1*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 10 пациентов, составила 100% (интервал 69,2-100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

- в отношении мутации T300G диагностическая чувствительность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов с мутацией T300G в гене *BRCA1*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 29 пациентов, составила 100% (интервал 88,1-100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.5. Диагностическая специфичность:

- в отношении мутации 3819del5 диагностическая специфичность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов без мутации 3819del5 в гене *BRCA1*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 213 пациентов, составила 100% (интервал 98,3-100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- в отношении мутации T300G диагностическая специфичность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов без мутации T300G в гене *BRCA1*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 194 пациентов, составила 100% (интервал 98,1-100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.6. Воспроизводимость результатов:

При тестировании в двух независимых постановках двумя разными операторами на двух сериях набора образцов с разными генотипами в 10 повторах каждый внутривосстановочная, внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость результатов составила 100 %.

3.7. Потенциально интерферирующие вещества.

В клинических испытаниях показано отсутствие влияния потенциально интерферирующих веществ в образцах буккального эпителия (муцина до 2 %, крови до 5%) и образцах цельной крови (гемоглобина до 229 г/л, билирубина до 0,2 мг/мл, триглицеридов до 30 мг/мл,

альбумина до 90 мг/мл) на результаты анализа.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Лаборатории, выполняющие исследования по определению мутаций 3819del5 и T300G в гене *BRCA1*, обязаны обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике. К работе с набором допускается только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским, или биологическим образованием, прошедший подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с патогенными для человека микроорганизмами и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

4.3. Некоторые компоненты (КО1 и КО2) содержат натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором необходимо надевать одноразовые медицинские перчатки, использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор планшетного типа с детекцией флуоресценции в режиме реального времени (с каналами детекции «FAM» и «ROX»):

«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТпрайм», (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

– ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», АО «Ламинарные системы, Россия»);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– мини-шейкер планшетный, обеспечивающий частоту вращения 1200-1800 об/мин (например, «PSU-2T», фирма «BioSan», Латвия или «BioShake iQ» фирма «Analytik Jena», Германия);

– микроцентрифуга для пробирок вместимостью 2 мл, обеспечивающая 13000 об/мин (например, «Eppendorf MiniSpin», фирма «Eppendorf», Германия);

– встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, фирма «Sartorius», Германия);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл (например, фирма SSI, США);

– контейнер для сбора отходов (например, «Контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);

– нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется со-

гласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

При проведении работ с клиническими образцами в лаборатории, включая процесс выделения ДНК из них, необходимо обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Для анализа подготовить клинические образцы (цельной крови и Buccalного эпителия) с помощью наборов для выделения ДНК.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с использованием набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов цельной крови и Buccalного эпителия проводить согласно инструкции по применению набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Внимание! С момента окончания центрифугирования (п. 7.2.6 Инструкции по применению набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс») до удаления надосадочной жидкости (п. 7.2.7 Инструкции) должно пройти не более 5 минут.

Элюцию образцов проводить элюирующим раствором «Генетика», который является компонентом данного набора.

После вскрытия флакона элюирующий раствор «Генетика» хранить при температуре (2-8) °C не более 3 месяцев.

6.1.2. Выделение ДНК с использованием набора реагентов «РеалБест ГенМаг».

Выделение ДНК из образцов цельной крови проводить согласно инструкции по применению набора «РеалБест ГенМаг».

6.1.3. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °C не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-26) °C не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая КО1 и КО2) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Неиспользованные пробирки с ГРС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки ГРС хранить при температуре (2-8) °C не более 3 месяцев.

КО1 и КО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.2. Аккуратно удалить плёнку, закрывающую пробирки.

Внимание! При удалении плёнки следите, чтобы вместе с ней не была удалена ГРС.

В каждую пробирку дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Время от начала внесения в ГРС до запуска ПЦР должно быть не более 30 минут.

Заклеить пробирки оптической плёнкой.

Внимание! Нельзя наносить на оптическую плёнку какие-либо надписи. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200-1800 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК и детекции кривых плавления в соответствии с инструкцией к прибору.

Протоколы проведения реакции амплификации:

для прибора «CFX96»:

— 1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °С до 75 °С с шагом 1 °С в течение 5 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °С – 1 минута.

для прибора «ДТпрайм»:

— 1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °С до 75 °С с шагом 1 °С в течение 13 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °С – хранение.

7.6. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда

и продукта амплификации для регистрации мутаций в гене *BRCA1*:

«FAM» – регистрация мутации 3819del5;

«ROX» – регистрация мутации T300G.

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.8. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

Для КО1 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления. Значения температур плавления должны находиться в диапазоне температур для КО1, указанном во вкладыше к наборам данной серии.

Для КО2 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления. Значения температур плавления должны находиться в диапазоне температур для КО2, указанном во вкладыше к наборам данной серии.

8.2. Анализ результатов определения мутаций 3819del5 и T300G в гене *BRCA1*.

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в каналах детекции «FAM» и «ROX» должен фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться значение температуры плавления.

8.2.2. Генотип анализируемого образца учитывается как «Нормальная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО1.

8.2.3. Генотип анализируемого образца учитывается как «Мутантная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО2.

8.2.4. Генотип анализируемого образца учитывается как «Гетерозигота», если для этого образца фиксируется наличие двух пиков плавления, при этом значение одного отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО1, а температура второго отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО2.

Ген	Мутация	Канал	ГЕНОТИП		
			«Нормальная гомозигота»	«Мутантная гомозигота»	«Гетерозигота»
			Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °C от KO1	Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °C от KO2	Два пика плавления, отличаются не более чем на 2 °C от KO1 и KO2
<i>BRCA1</i>	3819del5	«FAM»	N/N	del5/del5	N/del5
<i>BRCA1</i>	T300G	«ROX»	T/T	G/G	T/G

N – норма (отсутствие мутации).

Внимание! В связи с высокой клинической значимостью мутаций в гене *BRCA1* рекомендуется проводить повторное генотипирование гетерозиготных и мутантных гомозиготных образцов.

Ген *BRCA1* жизненно необходим для развития эмбриона, индивиды с наличием наследственных мутаций 3819del5 или 300G одновременно в двух аллелях в генотипе по литературным данным нежизнеспособны.

8.2.5. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2 °C от значений, полученных для KO1 и/или KO2, либо пики плавления отсутствуют. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту.

Сомнительный результат может быть вызван слишком низкой концентрацией геномной ДНК в реакционной смеси (вследствие неправильного забора материала, ошибок при пробоподготовке или при использовании неподходящего метода выделения ДНК). Количество копий генома человека в выделенном образце ДНК может быть проверено с использованием набора реагентов «РеалБест Валидация образца», выявляющего фрагмент аутосомного уникального гена человека *HMBS*. Если для анализируемого образца значение Ct ДНК гена *HMBS* по каналу «ROX» больше 33 или не определяется (то есть содержание в реакционной смеси копий (геном-эквивалентов) ДНК гена *HMBS* менее 250), то это свидетельствует о недостаточном количестве ДНК в выделенном образце. Необходимо провести повторный забор для исследования образца буккального эпителия или провести повторный анализ образца цельной крови, начиная с этапа выделения ДНК.

8.3. Диагностическая значимость.

Многочисленные исследования показали, что вероятность развития рака молочной железы (РМЖ) и рака яичников (РЯ) у носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* крайне высока. По данным мета-анализа риск развития РМЖ к 70 годам составляет 55% для носите-

лей мутаций в гене *BRCA1* и 47% для носителей мутаций в гене *BRCA2*, риск развития РЯ 39% для *BRCA1* и 17% для *BRCA2*, при этом зачастую наблюдается ранний возраст возникновения рака. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* повышают риск развития и других злокачественных новообразований (рак простаты, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак горлани), а также накладывают особенности на клиническое течение онкозаболевания.

Учитывая высокую вероятность развития онкопатологии, определение мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* целесообразно в группах высокого риска со случаями рака у кровных родственников, а также актуально для применения в скрининговых программах по оценке риска РМЖ и РЯ. Ранняя диагностика мутаций позволяет принять эффективные меры, предотвращающие развитие заболевания. Применение данного диагностического подхода может способствовать снижению заболеваемости РМЖ и РЯ.

Более подробно ознакомиться с диагностической значимостью мутаций 3819del5 и T300G в гене *BRCA1* можно в литературе:

1. Соколенко А., Розанов М., Митюшкина Н., Шерина Н. и др. Наследственные мутации при ранних, семейных и билатеральных формах рака молочной железы у пациенток из России. // Сибирский онкологический журнал. 2008. Т.27 (№3). С. 43–49.

2. J. Balmaña et al., Клинические рекомендации ESMO по диагностике, лечению и наблюдению у больных раком молочной железы с наличием BRCA-мутации // Минимальные клинические рекомендации Европейского Общества Медицинской Онкологии (ESMO) Редакторы русского перевода: проф. С. А. Тюлядин, к.м.н. Д. А. Носов; проф. Н. И. Переводчикова, — М.: Издательская группа РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2010.— 436 с.

3. Любченко Л.Н., Батенева Е.И., Абрамов И.С., Емельянова М.А., Будик Ю.А., Тюлядина А.С., Крохина О.В., Воротников И.К., Соболевский В.А., Наседкина Т.В., Портной С.М. Наследственный рак молочной железы и яичников // Злокачественные опухоли. 2013. № 2. с.53-61.

4. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. 2010. Т.11. № 4. с. 258-266.

5. Часовникова О.Б., Митрофанов Д.В., Демченко Д.О., Сидоров С.В., Францкевич О.З., Коваленко С.П. Анализ встречаемости девяти мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы в Сибирском регионе. // Сибирский онкологический журнал. 2010. Т. 41 (№5). С. 32–35.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

9.5. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика BRCA1 3819del5/T300G», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел.: (383) 252-51-62, 227-60-30; тел./факс: (383) 252-51-81, 252-51-77;

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

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



Я.Э. Новикова

Прошито в количестве 14 листов
«06» 12 2021 года
Директор клинических исследований и
дополнительных сервисов Дирекции
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»

Я.Э.Новикова



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для определения мутаций 3819del5 и T300G в гене *BRCA1*

методом полимеразной цепной реакции с детекцией кривых плавления

«РеалБест-Генетика *BRCA1* 3819del5/T300G»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения мутаций 3819del5 и T300G в гене *BRCA1* методом полимеразной цепной реакции с детекцией кривых плавления «РеалБест-Генетика *BRCA1* 3819del5/T300G» предназначен для качественного определения генотипа по мутациям 3819del5 и T300G в гене *BRCA1*, ассоциированным с риском развития рака молочной железы/рака яичников (РМЖ/РЯ), методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией кривых плавления в режиме реального времени. Набор может быть применён как вспомогательное средство диагностики при определении наследственных факторов риска развития РМЖ/РЯ и у пациентов с уже выявленным РМЖ/РЯ для уточнения разновидности рака (семейная форма, ассоциированная с мутацией гена *BRCA1*). Набор может быть применён для образцов геномной ДНК человека, выделенной из цельной крови или Buccalного эпителия.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота).

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) <i>Описание.</i>	Количество
Контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	1 пробирка, 1 мл
Контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	1 пробирка, 1 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) <i>Лиофилизированная</i>	48 пробирок
Элюирующий раствор «Генетика» <i>Бесцветная жидкость</i>	2 фл., по 12 мл
Оптическая пленка	1 лист
Вкладыш с информацией о диапазонах температур плавления для КО1 и КО2	1 шт.

2.3. Условия применения.

Аналитические и диагностические характеристики набора были валидированы при выделении ДНК из клинических образцов (цельной крови, буккального эпителия) с использованием наборов реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс», «РеалБест ГенМаг» производства АО «Вектор-Бест», позволяющих получить концентрацию ДНК человека не менее 250 копий на реакционную пробирку (на 50 мкл препарата выделенной ДНК).

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) или «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

Показания к применению.

Набор может быть применён как вспомогательное средство диагностики при определении наследственных факторов риска развития РМЖ/РЯ и у пациентов с уже выявленным РМЖ/РЯ для уточнения разновидности рака (семейная форма, ассоциированная с мутацией гена BRCA1). Набор может быть применён для образцов геномной ДНК человека, выделенной из цельной крови или буккального эпителия.

Противопоказаний к применению медицинского изделия нет (не применимо).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность набора по стандартному образцу предприятия, содержащему образцы с известными генотипами по мутациям 3819del5 и T300G в гене *BRCA1*, определенными методом секвенирования по Сэнгеру, составляет 100 %.

3.2. Аналитическая чувствительность – минимальное количество ДНК человека, достаточное для получения валидного результата анализа, 250 копий на реакционную пробирку (на 50 мкл препарата выделенной ДНК).

3.3. Аналитическая специфичность – для оценки аналитической специфичности был проведен *in silico* анализ последовательностей праймеров и зондов по базе нуклеотидных последовательностей ДНК человека и по базам последовательностей вирусов и микроорганизмов, которые могут присутствовать в ротовой полости или в крови. Перекрестно реагирующих нецелевых участков генома человека и вирусов или микроорганизмов обнаружено не было. Возможность перекрестных реакций исключена.

3.4. Диагностическая чувствительность:

- в отношении мутации 3819del5 диагностическая чувствительность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов с мутацией 3819del5 в гене *BRCA1*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 10 пациентов, составила 100% (интервал 69,2-100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

- в отношении мутации T300G диагностическая чувствительность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов с мутацией T300G в гене *BRCA1*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 29 пациентов, составила 100% (интервал 88,1-100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.5. Диагностическая специфичность:

- в отношении мутации 3819del5 диагностическая специфичность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов без мутации 3819del5 в гене *BRCA1*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 213 пациентов, составила 100% (интервал 98,3-100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- в отношении мутации T300G диагностическая специфичность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов без мутации T300G в гене *BRCA1*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 194 пациентов, составила 100% (интервал 98,1-100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.6. Воспроизводимость результатов:

При тестировании в двух независимых постановках двумя разными операторами на двух сериях набора образцов с разными генотипами в 10 повторах каждый внутривы-

вочная, внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость результатов составила 100 %.

3.7. Потенциально интерферирующие вещества.

В клинических испытаниях показано отсутствие влияния потенциально интерферирующих веществ в образцах буккального эпителия (муцина до 2 %, крови до 5%) и образцах цельной крови (гемоглобина до 229 г/л, билирубина до 0,2 мг/мл, триглицеридов до 30 мг/мл, альбумина до 90 мг/мл) на результаты анализа.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 26 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Лаборатории, выполняющие исследования по определению мутаций 3819del5 и T300G в гене *BRCA1*, обязаны обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике. К работе с набором допускается только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским, или биологическим образованием, прошедший подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с патогенными для человека микроорганизмами и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

4.3. Некоторые компоненты (KO1 и KO2) содержат натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором необходимо надевать одноразовые медицинские перчатки, использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими сред-

ствами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор планшетного типа с детекцией флуоресценции в режиме реального времени (с каналами детекции «FAM» и «ROX»):

«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТпрайм», (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

– ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», АО «Ламинарные системы, Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– мини-шейкер планшетный, обеспечивающий частоту вращения 1200-1800 об/мин (например, «PSU-2T», фирма «BioSan», Латвия или «BioShake iQ» фирма «Analytik Jena», Германия);

– микроцентрифуга для пробирок вместимостью 2 мл, обеспечивающая 13000 об/мин (например, «Eppendorf MiniSpin», фирма «Eppendorf», Германия);

– встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, фирма «Sartorius», Германия);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл (например, фирма SSI, США);

- контейнер для сбора отходов (например, «Контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);
- нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

При проведении работ с клиническими образцами в лаборатории, включая процесс выделения ДНК из них, необходимо обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Для анализа подготовить клинические образцы (цельной крови и буккального эпителия) с помощью наборов для выделения ДНК.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с использованием набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов цельной крови и буккального эпителия проводить согласно инструкции по применению набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Внимание! С момента окончания центрифугирования (п. 7.2.6 Инструкции по применению набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс») до удаления надосадочной жидкости (п. 7.2.7 Инструкции) должно пройти не более 5 минут.

Элюцию образцов проводить элюирующим раствором «Генетика», который является компонентом данного набора.

После вскрытия флакона элюирующий раствор «Генетика» хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

6.1.2. Выделение ДНК с использованием набора реагентов «РеалБест ГенМаг».

Выделение ДНК из образцов цельной крови проводить согласно инструкции по применению набора «РеалБест ГенМаг».

6.1.3. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-26) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество

(по числу подготовленных проб, включая КО1 и КО2) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Неиспользованные пробирки с ГРС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки ГРС хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

КО1 и КО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.2. Аккуратно удалить плёнку, закрывающую пробирки.

Внимание! При удалении плёнки следите, чтобы вместе с ней не была удалена ГРС.

В каждую пробирку дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Время от начала внесения в ГРС до запуска ПЦР должно быть не более 30 минут.

Заклеить пробирки оптической плёнкой.

Внимание! Нельзя наносить на оптическую плёнку какие-либо надписи. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200-1800 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК и детекции кривых плавления в соответствии с инструкцией к прибору.

Протоколы проведения реакции амплификации:

для прибора «CFX96»:

— 1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °С до 75 °С с шагом 1 °С в течение 5 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °С – 1 минута.

для прибора «ДТпрайм»:

— 1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

- 2 стадия: 95 °C – 2 минуты;
- 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд);
- 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °C до 75 °C с шагом 1 °C в течение 13 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);
- 5 стадия: 10 °C – хранение.

7.6. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для регистрации мутаций в гене *BRCA1*:

«FAM» – регистрация мутации 3819del5;

«ROX» – регистрация мутации T300G.

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.8. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

Для КО1 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления. Значения температур плавления должны находиться в диапазоне температур для КО1, указанном во вкладыше к наборам данной серии.

Для КО2 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления. Значения температур плавления должны находиться в диапазоне температур для КО2, указанном во вкладыше к наборам данной серии.

8.2. Анализ результатов определения мутаций 3819del5 и T300G в гене *BRCA1*.

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в каналах детекции «FAM» и «ROX» должен фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться значение температуры плавления.

8.2.2. Генотип анализируемого образца учитывается как «Нормальная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО1.

8.2.3. Генотип анализируемого образца учитывается как «Мутантная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО2.

8.2.4. Генотип анализируемого образца учитывается как «Гетерозигота», если для этого образца фиксируется наличие двух пиков плавления, при этом значение одного

отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1, а температура второго отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

Ген	Мутация	Канал	ГЕНОТИП		
			«Нормальная гомозигота»	«Мутантная гомозигота»	«Гетерозигота»
			Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО1	Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО2	Два пика плавления, отличаются не более чем на 2 °С от КО1 и КО2
BRCA1	3819del5	«FAM»	N/N	del5/del5	N/del5
BRCA1	T300G	«ROX»	T/T	G/G	T/G

N – норма (отсутствие мутации).

Внимание! В связи с высокой клинической значимостью мутаций в гене *BRCA1* рекомендуется проводить повторное генотипирование гетерозиготных и мутантных гомозиготных образцов.

Ген *BRCA1* жизненно необходим для развития эмбриона, индивиды с наличием наследственных мутаций 3819del5 или 300G одновременно в двух аллелях в генотипе по литературным данным нежизнеспособны.

8.2.5. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2 °С от значений, полученных для КО1 и/или КО2, либо пики плавления отсутствуют. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту.

Сомнительный результат может быть вызван слишком низкой концентрацией геномной ДНК в реакционной смеси (вследствие неправильного забора материала, ошибок при пробоподготовке или при использовании неподходящего метода выделения ДНК). Количество копий генома человека в выделенном образце ДНК может быть проверено с использованием набора реагентов «РеалБест Валидация образца», выявляющего фрагмент аутосомного уникального гена человека *HMBS*. Если для анализируемого образца значение Ct ДНК гена *HMBS* по каналу «ROX» больше 33 или не определяется (то есть содержание в реакционной смеси копий (геном-эквивалентов) ДНК гена *HMBS* менее 250), то это свидетельствует о недостаточном количестве ДНК в выделенном образце. Необходимо провести повторный забор для исследования образца буккального эпителия или провести повторный анализ образца цельной крови, начиная с этапа выделения ДНК.

8.3. Диагностическая значимость.

Многочисленные исследования показали, что вероятность развития рака молочной железы (РМЖ) и рака яичников (РЯ) у носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* крайне высока. По данным мета-анализа риск развития РМЖ к 70 годам составляет 55% для носителей мутаций в гене *BRCA1* и 47% для носителей мутаций в гене *BRCA2*, риск развития РЯ 39% для *BRCA1* и 17% для *BRCA2*, при этом зачастую наблюдается ранний возраст возникновения рака. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* повышают риск развития и других злокачественных новообразований (рак простаты, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак гор-тани), а также накладывают особенности на клиническое течение онкозаболевания.

Учитывая высокую вероятность развития онкопатологии, определение мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* целесообразно в группах высокого риска со случаями рака у кровных родственников, а также актуально для применения в скрининговых программах по оценке риска РМЖ и РЯ. Ранняя диагностика мутаций позволяет принять эффективные меры, предотвращающие развитие заболевания. Применение данного диагностического подхода может способствовать снижению заболеваемости РМЖ и РЯ.

Более подробно ознакомиться с диагностической значимостью мутаций 3819del5 и T300G в гене *BRCA1* можно в литературе:

1. Соколенко А., Розанов М., Митюшкина Н., Шерина Н. и др. Наследственные мутации при ранних, семейных и билатеральных формах рака молочной железы у пациенток из России. // Сибирский онкологический журнал. 2008. Т.27 (№3). С. 43–49.

2. J. Balmaña et al., Клинические рекомендации ESMO по диагностике, лечению и наблюдению у больных раком молочной железы с наличием *BRCA*-мутации // Минимальные клинические рекомендации Европейского Общества Медицинской Онкологии (ESMO) Редакторы русского перевода: проф. С. А. Тюлядин, к.м.н. Д. А. Носов; проф. Н. И. Переводчикова, — М.: Издательская группа РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2010.— 436 с.

3. Любченко Л.Н., Батенева Е.И., Абрамов И.С., Емельянова М.А., Будик Ю.А., Тюлядина А.С., Крохина О.В., Воротников И.К., Соболевский В.А., Наседкина Т.В., Портной С.М. Наследственный рак молочной железы и яичников // Злокачественные опухоли. 2013. № 2. с.53-61.

4. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. 2010. Т.11. № 4. с. 258-266.

5. Часовникова О.Б., Митрофанов Д.В., Демченко Д.О., Сидоров С.В., Францкевич О.З., Коваленко С.П. Анализ встречаемости девяти мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы в Сибирском регионе. // Сибирский онкологический журнал. 2010. Т. 41 (№5). С. 32–35.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

9.5. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика BRCA1 3819del5/T300G», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел.: (383) 252-51-62, 227-60-30; тел./факс: (383) 252-51-81, 252-51-77;

E-mail: plkobik@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

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

А.В. Трухина

В.К. Ткачев



Я.Э. Новикова

Прошито в количестве 12 листов
«12» 04 2022 года

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

Я. Э. Новикова

